

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A szárazságtűrés élettani hátterének vizsgálata
Arabidopsis modellnövényen és transzgenikus
szárazságtűrő növények előállítása**

Bacsó Renáta



BCE KETK Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

Budapest
2009

A doktori iskola

megnevezése:	Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
vezetője:	Dr. Tóth Magdolna egyetemi tanár, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcstermő Növények Tanszék
Témavezető:	Dr. Papp István Egyetemi docens, PhD Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009 december 8-ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Palkovics László, DSc, BCE

Tagjai

Zámboriné Németh Éva, DSc, BCE

Jenes Barnabás, DSc, MBK

Kiss Erzsébet, CSc, SZIE

Tőkei László, CSc, BCE

Opponensek

Mészáros Annamária, PhD, MTA MgKI

Nagyné Sárdi Éva, DSc, BCE

Titkár

Halász Krisztián, PhD, BCE

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	7
2. CÉLKITŰZÉS.....	10
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	12
3.1. SZÁRAZSÁGTŰRÉS ÉS A LÚDFŰ cbp20 MUTÁNSA	12
3.2. FOTOSZINTÉZIS ÉS PÁROLOGTATÁS.....	15
3.3. A SZÁRAZSÁGSTRESSZ HATÁSA	16
3.4. A SZÁRAZSÁGSTRESSZ KÖVETKEZMÉNYEINEK NYOMON KÖVETÉSÉRE ALKALMAS ÉLETTANI VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	17
3.4.1. Klorofill fluoreszcencia indukciós kinetika mérése	17
3.4.2. A termolumineszcencia	18
3.4.3. Vízpotenciál	19
3.4.4. Gravimetrikus víztartalom.....	19
3.4.5. Fotoszintetikus aktivitás mérése, porometria	20
3.5. A SZÁRAZSÁGTŰRÉS GAZDASÁGI JELENTŐSÉGE	20
3.6. A NÖVÉNYEK KÖZÖTTI KOMPETÍCIÓ.....	21
3.7. AZ ABSZCIZINSAV NÖVÉNYI HORMON SZEREPE A SZÁRAZSÁGRŰRÉSBEN.....	22
3.8. A NÖVÉNYTRANSZFORMÁCIÓ LEHETŐSÉGEI.....	23
3.9. AZ <i>AGROBACTERIUM</i> MINT TRANSZFORMÁCIÓS VEKTOR.....	24
3.10. PARADICSOM TRANSZFORMÁCIÓ.....	25
3.11. A GÉNCSENDESÍTÉS LEHETŐSÉGEI.....	27
3.11.1 A poszttranszkripciós géncsenedesítés (PTGS)	27
3.12. A POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ HASZNÁLATA TRANSGÉN JELENLÉTÉNEK KIMUTATÁSÁRA...	30
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
4.1. A KÍSÉRLETI NÖVÉNYEK JELLEMZÉSE	31
4.1.1. <i>Arabidopsis</i> növények nevelése	31
4.1.2. Paradicsom növények nevelése	33
4.2. MÓDSZEREK	33
4.2.1. A HASZNÁLT MŰSZEREK ÁTTEKINTÉSE.....	33
4.2.2. A fotoszintézis mérésére használt műszerek általános jellemzése	34
4.2.3. Infra-vörös gáz analízis	35
4.2.4. A klorofill fluoreszcencia mérésének alapjai	36
4.2.5. Vízpotenciál mérés Scholander bombával	39
4.2.6. Termolumineszcencia mérésére használt műszer.....	40

4.3. AZ EZERMAGTÖMEG, A FRISS ZÖLD TÖMEG ÉS A CSÍRÁZÓKÉPESSÉG MEGHATÁROZÁSA.....	41
4.4. GÉNSEBÉSZETI ELJÁRÁSOK.....	41
4.4.1. A génkonstrukciók előállításához felhasznált vegyszerek	41
4.4.2. Az alkalmazott baktériumtörzsek	41
4.4.3 A kísérletek során használt plazmidok	42
4.4.4. DNS kivonás	42
4.4.5. PCR reakció növényi DNS templáton, szekvencia meghatározás.....	42
4.4.6. <i>Escherichia coli</i> és <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transzformálása	42
4.4.7. Paradicsom és burgonya géncsendesítő konstrukció készítése	43
4.4.8. Rizs géncsendesítő konstrukció készítése	44
4.5. PARADICSOM TRANSZFORMÁCIÓ.....	45
4.5.1. Steril magvetés	45
4.5.2. Sziklevel transzformáció	45
4.5.3. Levél transzformáció	48
5. EREDMÉNYEK	49
5.1. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> CV. COLUMBIA VAD FAJ ÉS A <i>cbp20</i> MUTÁNS FITNESS PARAMÉTEREK MŰSZERES VIZSGÁLATAI	49
5.2. AZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA cbp20</i> MUTÁNS ÉS A VAD FAJTA MAGHOZAMÁ-NAK, EZERMAG TÖMEGÉNEK, FRISS SÚLYÁNAK ÉS CSÍRÁZÓKÉPESSÉGÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA	55
5.3. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> cv. COLUMBIA ÉS <i>cbp20</i> MUTÁNS VIZSGÁLATAI A NÖVÉNYEK VEGYES ÜLTETÉSE ESETÉN.....	58
5.3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Columbia és <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Columbia <i>cbp20</i> mutáns vizsgálatai a növények egymással versengő helyzetében vízmegvonás mellett	58
5.3.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Columbia és <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Columbia <i>era-1</i> mutáns vizsgálatai a növények kompetíciós helyzetében vízmegvonás mellett.....	61
5.3.3. A növények vizsgálata csökkentett vízutánpótlás mellett	62
5.4 A <i>CBP20</i> GÉN SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AZ ALTERNATÍV SPLICING („ÖSSZEVÁGÓDÁS“) MECHANIZMUSÁBAN	64
5.5. AZ <i>ARABIDOPSIS CBP20</i> GÉN HOMOLÓGJÁNAK AZONOSÍTÁSA PARADICSOMBAN ÉS GÉNCSENDESÍTŐ KONSTRUKCIÓ KÉSZÍTÉSE.....	65
5.6. <i>ARABIDOPSIS CBP20</i> GÉN HOMOLÓGJÁNAK AZONOSÍTÁSA RIZSBEN, ÉS GÉNCSENDESÍTŐ KONSTRUKCIÓ KÉSZÍTÉSE	67
5.7. A PARADICSOM TRANSZFORMÁLÁS EREDMÉNYEI.....	69
5.7.1. Levél transzformáció.....	69
5.7.2. Sziklevel transzformáció	70
5.8. A PARADICSOM TRANSZFORMÁCIÓ IGAZOLÁSA PCR REAKCIÓVAL	71
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	73
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	74
7.1. <i>ARABIDOPSIS</i> NÖVÉNYEKEN VÉGZETT MŰSZERES FITNESS VIZSGÁLATOK.....	74
7.2. A HASZNÁLT MŰSZEREK ÉS MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA	75
7.3. MAGHOZAM ÉS CSÍRÁZÓKÉPESSÉG VIZSGÁLATA	75

7.4. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> CV. COLUMBIA <i>cbp20</i> ÉS <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> CV. COLUMBIA <i>era I</i> MUTÁNSOK VIZSGÁLATA VÍZÉRT VERSENGŐ HELYZETBEN.....	76
7.5. A MOLEKULÁRIS MECHANIZMUS (ALTERNATÍV SPLICING) VIZSGÁLATA.....	77
7.6. GÉNCSENDESÍTŐ KONSTRUKCIÓ KÉSZÍTÉSE PARADICSOMBAN, BURGONYÁBAN ÉS RIZSBEN	78
7.7. NÖVÉNYTRANSZFORMÁCIÓ	79
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	80
9. SUMMARY	83
10. MELLÉKLETEK	86
M/1 Irodalomjegyzék.....	86
M/2 Kísérleteink során használt indítószekvenciák.....	98
M/3. Kísérleteink során használt táptalajok.....	98
M/4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> és <i>Escherichia coli</i> kompetens sejt készítése	99
M/5 <i>Escherichia coli</i> transzformáció.....	100
M/6 Plazmidok emésztése.....	100
M/7 vektorba ligálás	100
M/8 Az elkészült plazmid restrikciós térképe a fordított tükörképi szekvencia összeállítása után	101
M/9 A felhasznált plazmidok térképei	102

1. BEVEZETÉS

A kultúrnövények szárazságtűrése napjainkban igen égető probléma. Az öntözéshez használható édesvíz-készlet folyamatos csökkenése, a csapadékhiány és a globális felmelegedés egyre nagyobb szárazság-stressznek teszi ki termesztett növényeinket. Ebben a helyzetben fontossá vált a növények vízfelvevő és párologtató rendszerének minél jobb megismerése és ezen ismeretek felhasználásával a növények vízvesztésének csökkentése. A szabadföldi zöldség-, gyümölcs- és gabonatermesztésben az egyedek szárazságtűrése nagy gyakorlati jelentőségű. A növények vízhiányos stresszre adott válasza az alap és alkalmazott kutatás kiemelt területe.

A szárazságtűrés fenotípusa rendkívül komplex, összehangolt élettani működés eredményeként alakul ki. A tudomány fejlődésével különböző módokon próbálták növelni a növények szárazságtűrését. A hagyományos nemesítés módszereit alkalmazva keresztezéssel és szelekciós stratégiákkal próbálnak kedvező tulajdonságú fajtákat előállítani (pl. a 218 309. magyar szabadalmi irat). A molekuláris biológia előretörésével egyre nagyobb szerepet kapnak a transzgenikus technikák, melyek segítségével könnyebben és gyorsabban megérthetőek azok a molekuláris szinten zajló folyamatok, melyek a növények szárazságtűrését döntően befolyásolják (Dudits, 2006).

Munkánk során modellnövények segítségével foglalkoztunk a növények vízvesztésével, párologtatásával. A növény vízvesztésének legnagyobb része párologtatással (transpirációval) történik. A párologtatás során a gázcserenyílásokon és kisebb részt a kutikulán át elpárologtatott víz hiánya a növényben a gyökérszóna felé irányuló szívóerőt kelt. Ez a vízpotenciál csökkenés vezet a talajból az atmoszféra felé irányuló vízáramláshoz, a talajban lévő víz kinyeréséhez (Turcsányi 1998).

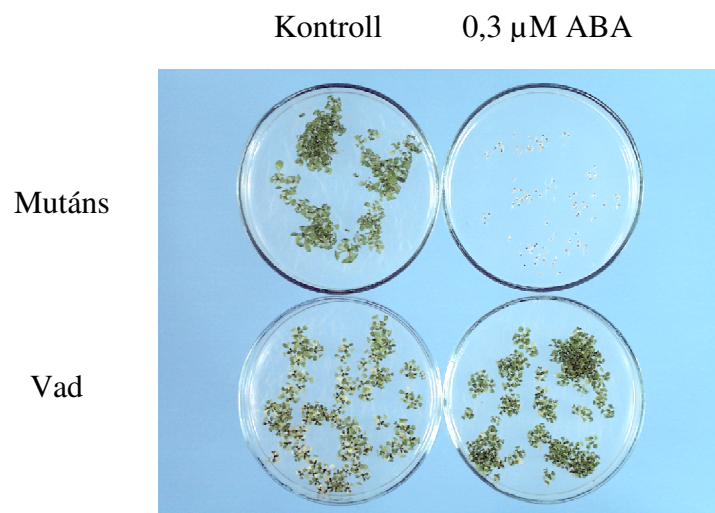
Az elpárologtatott víz mennyiségének, ezáltal a növény vízvesztésének fontos tényezői a sztóma nyílásának illetve záródásának mértéke, valamint a kutikula permeabilitása. Az abszcizinsav (ABA) számos stresszválaszban (pl. szárazság- ill. sóstressz) szerepet játszik, befolyásolja a gázcserenyílások záródását, így stresszhormonként működik (Marcotte et al., 1992; Koorneef et al., 1998). Az abszcizinsavval végzett számos kutatás ellenére sem tisztázott még teljesen az aktivált jelátvitel útja, illetve bizonyos ABA-ra érzékeny mutánsok stressztűrésének

mechanizmusa. Vizsgálataink során a *cbp20* ABA túlérzékenységet és szárazságtűrést okozó mutáció mechanizmusát, élettani következményeit és a jelátvitel fajok közötti konzerváltságát terveztük vizsgálni.

Munkánk előzményeként lúdfűben (*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia) olyan ABA-túlérzékeny mutánst sikerült izolálni, mely fokozott szárazságtűrési tulajdonsággal is rendelkezik. A mutáns a vad típusnál valamivel lassabban fejlődik, kompaktabb, azonban ahhoz nagyon hasonló morfológiájú, fertilis növény. A mutáció az *Arabidopsis* At5g44200 génjében történt, ami a Cap Binding Protein 20 (CBP20) fehérjét kódolja. A CBP20 a sejtmagi (nuclear) Cap Binding Complex (nCBC) része, amely az RNS Polimeráz II által átírt mRNS-ek 5' végére helyezett „cap” struktúrát köti. Az nCBC komplex legalább kettő, 80 illetve 20 kiloDalton molekulatömegű alegységekből áll. A két alegység együtt képes az mRNS 5' struktúráját megkötni. Az nCBC komplexnek szerepet tulajdonítanak az mRNA splicingjában, annak 3' végének érésében, illetve az mRNS magból való exportjában. A nagy alegységet érintő *abh1* mutációt Hugouvieux és munkatársai írták le (2001).

Az nCBC komplex működése az irodalomban publikált eredmények szerint növényekben nem létfontosságú, hiánya viszont a növény működését úgy változtatja meg, hogy az ABA-ra fokozottan érzékeny és szárazságtűrőbbé válik. Az *abh1* és *cbp20* mutánsok ABA túlérzékenységet jelzi, hogy képtelenek csírázásra olyan alacsony koncentrációjú ABA mellett, mely a vad típusú növény csírázását nem gátolja (lásd 1. ábra). Mindkét mutáns jellemzője, hogy a vad típusú növényénél kevesebb vizet párologtat, ami ellenállóbbá teszi őket a szárazsággal szemben. Ezt a kedvező fenotípust a gázcserenyílások gyors záródásával magyarázták, ami szintén ABA hatására következik be. A megváltozott RNS metabolizmus és vízháztartás a növény egyéb tulajdonságait csak kis mértékben érintik. Mivel a pleiotróp tulajdonságok ilyen kis fokúak, a mutáció gyakorlati hasznosítása is elképzelhető (Papp et al., 2004).

Az nCBC résztvevőinek homológjai az állat- és növényvilágban széles körben megtalálhatók. A növények között a hagyma, szőlő, saláta, szója, paradicsom, rizs biztosan tartalmaznak az azonosított CBP20-hoz nagy hasonlóságot mutató fehérjét. Mutáns fenotípus leírása azonban eddig egyedül *Arabidopsis* növény esetében hozzáférhető az irodalomban (Papp et al., 2004; Cutler et al., 1996).



1. ábra: Abszizinsav (ABA) hatása a vad típusú, illetve a CBP20 mutáns lúdfű csírázására MS táptalajon steril körülmények között

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* mutáns széleskörű molekuláris biológiai és élettani vizsgálatát tűztük ki célul, valamint a mutáció célzott előidézését kezdtük meg paradicsomban. Együttműködő partnereinkkel közösen burgonyában és rizsben is elkezdtük *cbp20* géncsendesített vonalak létrehozását.

A mutációhoz kapcsolódó molekuláris biológiai kísérletek a fenotípus kialakulásának mechanizmusát célozták. Munkánk kezdetekor az nCBC komplex, és ezen belül a CBP20 funkciója növényekben kevésbé kutatott terület volt. Az egyéb rendszerekben rendelkezésre álló információk alapján az mRNS metabolizmuson belül az alternatív splicingban próbáltuk szerepét vizsgálni.

Élettani kísérleteinkben nyomon akartuk követni, vajon stresszmentes állapotban a mutáns csökkentett gázcseréjének milyen hatása van a növény hozamjellemzőire, fotoszintetikus aktivitására és a fotoszintetikus rendszer kapacitására. A kérdések megválaszolására a hagyományos hozamjellemzők mérése mellett különböző növényélettani vizsgálati módszereket használtunk. Így megvizsgáltuk a normál állapotú, és a vízhiányos stressznek kitett növények élettani paramétereit, és azok változását. Mindemellett szeretnénk volna összehasonlítani a használt műszerek érzékenységét, és gyakorlati hasznosíthatóságukat is a vízhiányos állapot nyomon követésére.

Az élettani vizsgálatok mellett a mutáns növény ökofiziológiai jellemzését is célul tűztük ki. Meg kívántuk vizsgálni, vajon előnyt vagy hátrányt jelent-e a genetikai változás egy heterogén növénypopulációban stresszhelyzet esetén. Ebből a célból mutáns és a vad típusú növényeket egy tenyészedényben vegyesen ültettünk, majd szárazságstressznek tettük ki őket. Ezekbe a vizsgálatokba a *cbp20* mutáns mellett egy másik ABA túlérzékeny mutánst, az *era-1*-et is bevontuk, hogy megnézzük hasonlóan viselkedik-e a két mutáns az előidézett kompetitív helyzetekben.

Az nCBC-t alkotó alegységekhez nagy hasonlóságot mutató fehérjék széles körben megtalálhatók a növényvilágban. Ez arra enged következtetni, hogy az nCBC funkció is általános, szerepe a modellnövények mellett haszonnövényekben is vizsgálható. A paradicsom igen vízigényes, egyben kertészeti modellnövényként ismert. Hasonlóképpen a burgonya szárazságtűrése is nagy gazdasági jelentőségű. Mivel az *Arabidopsis cbp20* mutánsa esetében egy gén hibája okoz szárazságtűrést, célul tűztük ki e gén ortológjának megtalálását paradicsomban, burgonyában és rizsben. Ezt követően géncsendesítő konstrukciókat terveztünk létrehozni génszabványi eljárások segítségével, mely az *Arabidopsis CBP20* génnel nagy homológiát mutató paradicsom, burgonya és rizs géneket csendesítik. A Solanaceae családon belüli nagy szekvencia-homológia miatt a paradicsom géncsendesítő konstrukció a megfelelő burgonya génre is alkalmazhatónak tűnt. Feltételeztük, hogy paradicsomban és burgonyában a mutáció olyan hatásait is vizsgálhatjuk majd, ami *Arabidopsis*-ban nem hozzáférhető, például a húsos termés fejlődése és érése, gumóképzése. Az nCBC funkcióját egyszikű növényekben is tanulmányozni szeretnénk volna. A rizs genomában azonosítható volt egy, az *Arabidopsis CBP20* génnel erősen homológ szekvencia, aminek alapján géncsendesítő konstrukció volt tervezhető. Az elkészített génkonstrukciókat *Agrobacterium tumefaciens* segítségével juttathattuk paradicsomba, valamint együttműködő partnereink vállalták a burgonya és rizs transzformációkat.

Kísérleteink során egy rutinszerűen alkalmazható paradicsom génmanipulációs rendszert terveztünk beállítani. Ehhez két különböző transzformációs rendszer honosítását terveztük, hogy összehasonlíthassuk azok hatékonyságát, illetve gyakorlati hasznosíthatóságát. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a mutáns *Arabidopsis*-ban tapasztalt fenotípus megjelenik-e - és ha igen, akkor hogyan - egy húsos termést hozó haszonnövény esetében. Célunk volt a létrehozott transzformált paradicsomok fenotípusának elemzése, normál illetve vízhiányos állapotban. A burgonya transzformációját a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban Dr Bánfalvi Zsófia csoportjával együttműködve terveztük megvalósítani, a rizs transzformációra Dr Györgyey János munkacsoportjával van együttműködésünk (Szegedi Biológiai Központ).

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. SZÁRAZSÁGTŰRÉS ÉS A LÚDFŰ *cbp20* MUTÁNSA

A növényi nCBC valószínűsíthető részvétele az abiotikus stresszválaszban az állati rendszerekben nyert adatok alapján nem teljesen váratlan. Emlősben az nCBC komplex működését stressztől és növekedési faktoroktól függőnek találták. Ez alapján valószínűsíthető volt hogy szerepe az mRNS érésében nem háztartási („house-keeping”) funkció, azaz nem nélkülözhetetlen lépés, hanem egy poszttranszkripció szabályozási lehetőség (Papp et al., 2004).

Ez a feltételezés bizonyul igaznak, amikor az nCBC komplexben résztvevő fehérjéket kódoló génekben mutáns *Arabidopsis* vonalakat vizsgáljuk. A *cbp20 Arabidopsis* mutáns a vad típusnál valamivel lassabban fejlődik, kompaktabb, egyéb tekintetben azonban ahhoz hasonló morfológiájú, fertilis. A mutációt a Cap Binding Protein 20 (CBP20) génbe épült T-DNS okozza (2. ábra). A mutáns jellemzését munkánk előzményeként Papp és mtsai 2004 publikációja részletezte, ahol fény derült a CBP20 szerepére a stressztűrés folyamataiban is.



2. ábra Vad típusú (balra) és *cbp20* mutáns (jobbra) *Arabidopsis* növények

Az *Arabidopsis* növény szerveiben az nCBC komplex mindkét alegységének expressziós mintázata ismert, génjeik a hozzáférhető adatbázisok szerint a növény minden szövetében kifejeződnek. A nagy alegységet érintő *abh1* mutációt Hugouvieux (2002) írta le. Élesztő kéthibrid kísérlettel ugyanitt kimutatták, hogy az *Arabidopsis* CBP20 és CBP80 fehérjék kapcsolódni képesek. Az élesztőben kifejezett fehérjék csak együtt tudják az mRNS cap struktúrát kötni *in vitro*, tehát hasonlóan viselkednek az élesztőből izolált ortológjaikhoz.

Az nCBC mutánsok (*cbp20* és *abh1*) csírázását már a vad típusnál alacsonyabb koncentrációjú abszizinsav (ABA) is gátolja, ami azok ABA túlérzékenységet bizonyítja. Az ABA túlérzékenység a gázcserenyílások korai záródását, ezzel a vízvesztés csökkenését, végső soron a növény szárazsággal szembeni ellenállóképességének növekedését eredményezheti (Hugouvieux et al. 2002). A *cbp20* mutáns esetében a gázcserenyílások jó vízellátottság mellett is mintegy 50%-al kisebb sztómakonduktanciát tesznek lehetővé mint a vad típusnál. A növény vízvesztéssel szemben látható módon ellenállóbb a vad típusnál (3. ábra) (Papp et al., 2004).

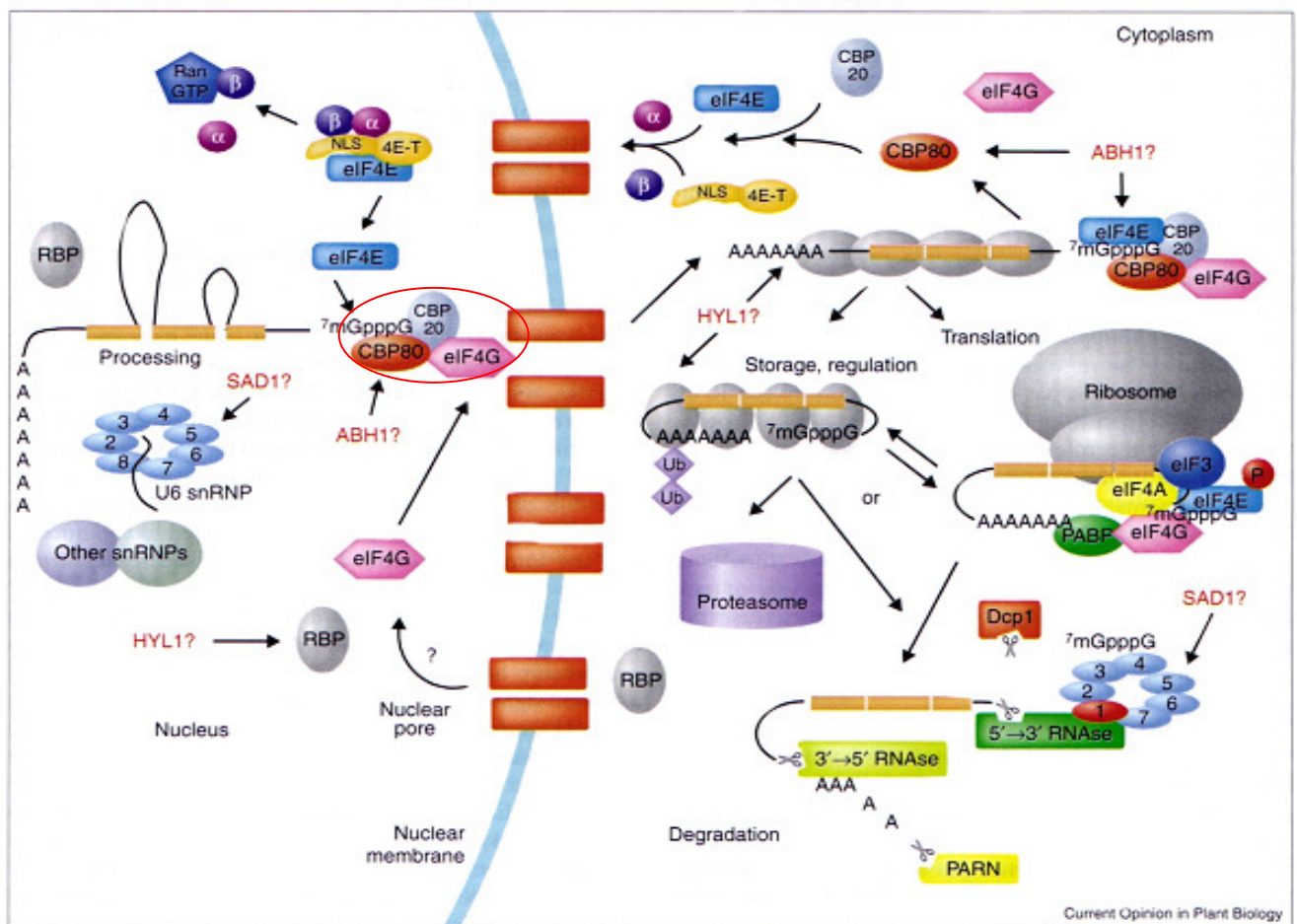


3. ábra Vad típusú 8 hetes (balra) és 9 hetes *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növények (jobbra) 8 nappal a vízutánpótlás megszüntetése után.

Az ABA jelátviteli útban a CBP20 és ABH1 mellett két másik RNS kötő fehérje részvételét is igazolták: a *hyl1* és *sad1* szintén ABA túlérzékeny mutánsok. Az RNS kötő fehérjék funkciója

általában igen sokrétű. Részt vesznek az RNS transzlációjában, az RNS kötésével befolyásolhatják annak stabilitását, magból való kijutását illetve összevágását („splicingját”) (Fedoroff, 2002) (4. ábra). Az adatok alapján így valószínűsíthető, hogy az ABA jelútban a poszttranszkripció szabályozás is jelentős szerepet játszik az RNS metabolizmus révén.

A legújabb eredmények szerint az nCBC RNS kötő komplex működési mechanizmusa a génszabályozásban az alternatív összevágás befolyásolása is lehet. Ennek során az mRNS a magból kijutva egy specifikus hasításon esik át, mely bizonyos intronok kivágásával különböző funkciójú géneket eredményezhet ugyanabból az mRNS templátból kiindulva. Ugyanakkor az intronok között nem mindegyik egyformán érzékeny az nCBC funkcióvesztésére, a leggyakrabban a sorrendben első intronok érintettek.



4. ábra: Az nCBC (piros körrel jelölve) helye az mRNS érési és szállítási folyamataiban
(forrás: Fedoroff et al., 2002)

A részletes molekuláris elemzés kiderítette, hogy ezekben a mutánsokban egyes kódoló mRNS-ek és bizonyos miRNS-ek prekursorainak érési folyamataiban is történt változás. A *cbp20*

illetve az *abh1* mutánsban a pre-miRNS-ek egy részének érés előtti szintje megemelkedett, a megfelelő érett miRNS-ek szintje pedig lecsökkent a Col-0 vad típushoz viszonyítva. Az ABA direkt kapcsolódását is sikerült bizonyítani az nCBC-hez. Mindemellett e komplex működésének hiánya nem okoz alapvető zavarokat az életfunkciókban (Laubinger et al., 2008). Ez azt jelenti, hogy ez a mechanizmus egy új génregulációs mechanizmust képviselhet. Az 5. ábrán az nCBC működésének helye látható az mRNS érési folyamataiban.

Az eddig részletezett eredmények hasznosíthatóságát a növénytermesztési gyakorlatban befolyásolja az, hogy az nCBC mutáns növények életképessége mennyiben szenved károsodást a mutáció következményeitől. Egy életképességet rontó tényező lehet a csökkent gázcsere miatt esetlegesen romló fotoszintetikus hatékonyság. Első vizsgálataink arra irányultak, hogy megállapítsuk vajon a *cbp20* mutáns fotoszintetikus rendszerében történt-e hatékonyság csökkenés, illetve a mutáció hogyan befolyásolja a fotoszintézist romló vízellátás mellett. E célból a *cbp20* lúdfű mutáns fotoszintetikus rendszerét fluoreszcenciós kinetikai módszerrel vizsgáltuk valamint a fotoszintézis hatékonyságát mértük jó vízellátás mellett és szárazságstressz hatása alatt.

3.2. FOTOSZINTÉZIS ÉS PÁROLOGTATÁS

A fényenergia hasznosítás kezdeti lépéseit a növények kloroplasztjában a klorofill molekulák és egyéb kísérő színanyagok felelősek. A beeső fény ezeket a molekulákat gerjeszti, ahonnan a gerjesztett elektron a befogadó reakciócentrum fehérje komplexének adódik át. A PSII fotokémiai rendszerben a klorofill-a molekula 685 nm hullámhosszú fényt nyel el. A molekula ettől aktiválódik, és képes egy elektront átadni a D1 fehérjéhez kötődő feofitin-a molekulának. A feofitin-a molekuláról az elektron a D2 fehérjéhez kötődő plasztokinon (Q_A) molekulának adódik át, majd innen a Q_B molekulára vándorol, ami azonban 2 elektron befogadására képes. Ez a molekula a sztrómából két H^+ iont vesz fel, így Q_BH_2 -vé alakul, és leszakadva a D1-ről mobilizálódik a lipidsrétegben. A szállított két elektront és két H^+ -t a citokróm_{b/f} komplexnek adja át, ahonnan az elektronok a plasztocianinra, míg a protonok a lumenbe jutnak. Az elektronok innen tovább szállítódnak a PSI-be. Ezek az ún. fotokémiai reakciók a reakció centrumokban zajlanak le. A PSII-ben a D1 és D2 fehérjékhez kötődő Mn ionok oxidációs állapotának változása olyan erős komplex létrejöttét okozza, mely képes a vizet bontani O_2 képződésével (Szalai, 2004).

A növényekben a víz elpárologtatása a legnagyobb arányban gázcsere nyílások (sztómák) segítségével történhet. Vízvesztés e mellett történik a kutikulán keresztül (perisztómás párologtatás), sőt más utakon is (pl. lenticellákon át). Rövidtávon a növény elsősorban a sztómák segítségével szabályozza a gázcsere nyílást, ezzel a fotoszintézis és a párologtatás mértékét. A zárósejtek megduzzadásakor a cellulóz mikrofibrillumok lefutása és a sejtfalak vastagodásai miatt közöttük rés nyílik, ami a gázcsere nyílást lehetővé teszi (Haraszty, 2004). A szárazságstressz érzékelésében és a válaszok szabályozásában fontos szerepe van az abszcizinsav (ABA) növényi hormonnak, mely egyéb stresszhatásokra is termelődik a növényben.

A gázcsere nyílások gyors alakváltozásait közvetlenül ionáramlások okozzák. A Ca^{2+} , K^{+} és anionok beáramlása turgornövekedéshez vezet, mely a zárósejtek nyílását okozza. ABA hatására a kifelé irányuló K^{+} csatornák kinyílnak, átmeneti depolarizáció és Ca^{2+} szint emelkedés alakul ki a citoszolban. Így módon lassú anioncsatornák is aktiválódnak, melyeken át ionok jutnak ki a zárósejtekből, azok turgorát csökkentve. A párologtatás csökkentése céljából zártabb gázcsere nyílás a bejutó CO_2 útjában is akadályt képezhet. Hogy ennek a gyakorlatban van-e asszimilációt csökkentő hatása, a sztómazáródás fokától függhet (Erdei, 2004).

Bab növényen vizsgálták az asszimilációs rátát és a sztóma konduktanciát változó fényerősség hatására. 50-ről 350 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ -ra emelve a fényerősséget azt tapasztalták, hogy míg az asszimilációs ráta 10 perc alatt elérte maximum értékét, és állandósult, addig a sztóma konduktancia értéke 20 percig nem ért el egy állandó szintet (Hamlyn, 1998). Ez a kísérlet azt bizonyítja, hogy a gázcsere nyílások nem teljesen nyitott helyzete esetén is elérhető maximális fotoszintetikus asszimiláció.

3.3. A SZÁRAZSÁGSTRESSZ HATÁSA

A növények vízhiányra adott válasza igen komplex. A leveleken keresztül elpárologtatott víz miatt csökken a növényben a vízpotenciál. Ez a gyökerekben fokozott szívóhatást jelent, a száradó talajból azonban a növény egyre nehezebben tud vizet felvenni. ABA termelés indul meg, a gázcsere nyílásokra hatásos ABA koncentráció nő, a növény alkalmazkodik a stresszhelyzethez. A föld feletti részek növekedése leáll (Tardieu et al., 2000), a sztómák záródnak, párologtatás hiányában a víz sejtől sejtbe mozog, nagy hidraulikus ellenállás mellett. Kisebb stressz esetén a gyökér

növekedése erőteljesebb lesz, ABA termelődik benne (Sharp et al., 2004). A levél relatív víztartalma (RWC%) fokozatosan lecsökken (Chaves, 1991).

Kiszáradás hatására a gyökérben termelődő ABA a levélbe áramlik a xilémen át, és a gázcsere nyílások záródását okozza (Gowing et al., 1993). Erőteljes stressz esetén a levelekben helyben is történik ABA termelés. A stressz hatásra változó extracelluláris pH érték a gázcsere nyílásokig eljutó hatékony ABA koncentrációt is befolyásolja. Tardieu bizonyította a gyökér vízpotenciálja, és az ott képződő ABA mennyisége közötti egyenes arányosságot (1991). A levél víztartalma és a sztómakonduktancia között talált összefüggést Davies és Zhang (1991).

A vízhiány a levélben a sztómakonduktancia (G_s) és a CO_2 asszimiláció csökkenéséhez vezet. Ez eleinte a levél belső terében a CO_2 tartalom növekedését eredményezi (Lawlor, 2002). A rossz vízellátás későbbi következményeként a levél relatív víztartalma (RWC) és a belső CO_2 szint is alacsonyabb lesz. A turgornyomás és az ozmotikus potenciál változását Kaiser kutatásai szerint a sejtfal merevsége is befolyásolja (1987).

A fotoszintetikus rendszer védelmére több mechanizmus is kialakult. Ilyen például az enzimkatalizált glutation/oxidált glutation ciklus. Ennek során a glutation elektrondonor lehet az elektronszállításban, segítségével a képződő aktivált oxigénformákat méregteleníti a növény (Pethő, 2002). Nagyfokú, régóta fennálló szárazság esetén azonban már a kloroplasztiszok tartós szerkezeti károsodást is szenvednek, ami a fotoszintetikus aktivitás csökkenéséhez vezet. Ezt jelző értékek az egységnyi levélfelületre eső aktív Rubisco mennyisége, illetve a RuBP szintézis aránya, ami befolyásolja a fotoszintetikus aktivitást (Lawlor et al., 2001).

3.4. A SZÁRAZSÁGSTRESSZ KÖVETKEZMÉNYEINEK NYOMON KÖVETÉSÉRE ALKALMAS ÉLETTANI VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.4.1. Klorofill fluoreszcencia indukciós kinetika mérése

Az ún. Kautsky effektus során a gerjesztési energia a sötétben hirtelen megvilágított növényben indukált fénykibocsátást eredményez (Kautsky, 1960). Mivel a sötétben „nyitott“

(elektronok számára átjárható) reakciócentrumokat ilyenkor hirtelen telítjük, azaz "bezárjuk", csökken a fotokémia hatásfoka, ami megnövekedett fluoreszcenciához vezet.

Sötétadaptált minta megvilágításakor a fluoreszcencia nagyon rövid idő alatt egy kiindulási szintre ugrik, amit F_0 -nak nevezünk, majd egy maximumot ér el (F_p). Telítési fényintenzitás esetén F_p a maximális fluoreszcenciával egyenlő (F_m). F_m és F_0 különbsége adja az ún. változó fluoreszcenciát (F_v), ami a PS II fényenergia befogás hatásfokával arányos. Folytonos megvilágítás mellett a fluoreszcencia szintje fokozatosan lecsökken, köszönhetően a különböző kioltó mechanizmusoknak, mígnem eléri a folytonos szintet, melyet steady-state szintnek nevezünk (Maxwell et al., 2000). A fotokémiai és a nem fotokémiai kioltás műszeres elemzéssel, fluorométerekkel (pl. FSM, PAM) jól nyomon követhető.

A klorofill fluoreszcencia jelensége nyomán vizsgálható a fotokémia hatásfoka és működésének egyéb paraméterei. Ennek köszönhetően a módszer alkalmazása széles körben elterjedt. Then és munkatársai (2009) kanári fenyőben (*Pinus canariensis*) vizsgálták az ózon káros hatását a fotokémiai rendszerre, eredményeik szerint a jelenleg átlagosan a légkörben lévő ózontartalom még nem károsítja a növényeket.

Eullaffroy és munkatársai (2009) különböző herbicidek hatását vizsgálták, és jelentős fluoreszcencia-különbségeket mértek a különböző kezeléseket összehasonlítva. Saqrane és munkatársai (2009) Cyanobaktérium toxinok hatását vizsgálva szignifikáns különbséget találtak a különböző toxin koncentrációkkal kezelt növények fluoreszcenciája között.

Wright és munkatársai (2009) levágott szőlőnövényeket vizsgáltak, hogy megtudják alkalmas-e a klorofill fluoreszcencia a növény kiszáradásának nyomon követésére. Az ozmotikus potenciállal és a súlyvesztéssel párhuzamosan a klorofill fluoreszcencia mért értékei is viszonylag érzékenyen reagáltak a kiszáradásra, azonban a cikk megjegyzi: a gyakorlatban csak a lassú kiszáradást lehet jól nyomon követni ezen műszerek segítségével.

3.4.2. A termolumineszcencia

Egy előzetesen fénnel gerjesztett fagyasztott minta sötétben történő felmelegítése során fényt bocsát ki. A jelenséget termolumineszcenciának (TL) nevezik (Arnold és Sherwood, 1957),

magyarázatára többféle elmélet született. Az ún. töltés rekombináción alapuló elmélet kidolgozóit Sane és Rutherford (1986). Az alacsony hőmérsékleten gerjesztett minta több fotokémiai komponense (Q_A , Q_B , S_2 , S_3) képes az elnyelt energia tárolására. Mivel a gerjesztést követően a minta újra sötétbe kerül, ez az elraktározott energia nem vesz részt további fotokémiai reakcióban, a töltések az elektrontranszport lánc P680-hoz közelebb elhelyezkedő komponensein tárolódnak.

A környezeti hőmérséklet növelésével töltés rekombináció idézhető elő ezekben a mintákban. Ez azt jelenti, hogy a tárolt energia visszavándorol a klorofilokra, és ott fény formájában kisugárzódik a környezetbe, vagy pedig hővé alakul. Jelenleg több mint 10 TL sáv jelenlétéről tudunk, de többnek nem ismert még a funkciója (Vass és Inoue, 1992). Hideg és Vass olyan TL sávot is leírtak, mely lipid peroxidációs termékek és klorofill molekulák közti energiaátadásból ered (1994).

3.4.3. Vízpotenciál

A vízpotenciál érték mérésére több módszert is kifejlesztettek. A leggyakrabban használt eszköz a Scholander bomba, mely egy zárt térben emeli meg a nyomást, így a benne elhelyezett növényi részből a nedv visszanyomódik a vágási felületre, melyet a gépen kívül lehet megfigyelni. A nedvcsepp megjelenésekor mért nyomás megegyezik a levágott szerv vízpotenciáljával (Wei et al., 2000).

Caruso és munkatársai nyárfa vízpotenciálját és sztómakonduktanciáját vizsgálták PEG kezelés hatására, és a legérzékenyebb mutatónak a vízpotenciál értéket találták a szárazságstressz kimutatására (2007).

3.4.4. Gravimetrikus víztartalom

A talaj víztartalmának meghatározására szolgáló egyik legegyszerűbb módszer a gravimetrikus víztartalom mérés, melynek során a növénynevelő tenyészedények súlyát követjük nyomon. A mért értékből, a kiszáritott föld súlyával korrigálva, visszakövetkeztethető a talaj víztartalma a kísérlet

során. A víztartalom értékeit általában a kezdeti szántóföldi vízkapacitás százalékában adják meg (Beverly et al., 1994).

A módszert széles körben alkalmazzák a szárazságtűrés nyomon követésén túl (Bacsó et al., 2008/a) különböző pH és talajviszonyok vizsgálatára (Tietema et al., 1992), illetve különböző káros anyagok növényekre gyakorolt hatásainak nyomon követésére (Bhadoria et al., 1991) egyaránt.

Jellegéből adódóan ez a módszer csak laboratóriumi körülmények között tesz lehetőséget a szárazságstressz fokának meghatározására.

3.4.5. Fotoszintetikus aktivitás mérése, porometria

A nyitott rendszerű infravörös gázanalizátorok (IRGA) használata a növényi gázcsere jellemzésében széles körben elterjedt. Segítségükkel meghatározható a levél belső CO₂ koncentrációja, a fotoszintetikus aktivitás, és a sztómakonduktancia is.

Avola és munkatársai bab növényen (*Vicia faba*) vizsgálták a gázcsere és a különböző hőmérsékleti és fényintenzitási értékek összefüggéseit. IRGA műszer alkalmazásával különbségeket tudtak kimutatni az egyes fajták hő, illetve fényérzékenysége között, így a gyakorlati nemesítés alapjául szolgáló növényeket már fiatal korban vizsgálni tudták (2008).

Acosta és munkatársai (2008) az évszakok hatását vizsgálták a lucfenyők gázcseréjére, és jelentős különbséget mértek a nyári és a téli időszakok között.

3.5. A SZÁRAZSÁGTŰRÉS GAZDASÁGI JELENTŐSÉGE

A klímaváltozás napjainkban igen égető probléma. A csapadékhiány, és az emberi beavatkozás nyomán egyre nagyobb fokú elsivatagosodásra készülhetünk (Kertész, 2008). A növénytermesztésben kiemelten fontos az éves csapadék mennyisége, mely az édesvízkészletek csökkenésével várhatóan egyre jobban csökkenni fog (Szilágyi és Józsa, 2008).

Magyarország éghajlati jellemzője az aszályhajlam (Bussay et al., 1999). Az évi középhőmérsékletek sorozatában a 20. század folyamán növekvő tendencia figyelhető meg, ugyanakkor az éves csapadék mennyisége kis mértékben csökken (Nyíri, 1997). Mindezek következtében szükségessé vált szárazságtűrő növények előállítása, hiszen a termesztésben akár 100%-os termésvesztést is okozhat egy aszályos év.

Szárazságtűrőbb növények előállításával több nagy növénynevelő cég is foglalkozik a világon, hiszen ilyen fajták használatával nagyobb termésbiztonság és jobb adaptációs képesség érhető el. A Monsanto hagyományos nemesítéssel előállított DEKALB kukorica hibrid fajtáját aszályos területekre ajánlják, míg aszályos területen egy új GMO kukorica fajtával 6-10 %-os terméstöbbletet értek el más fajtákhoz képest (Monsanto, 2009).

Magyarországon 2007-ben a nagy fokú aszály miatt több mint 21 ezer hektár erdő száradt ki (Hirka és Csóka, 2007), a kukorica termésátlaga a felére esett vissza, és szinte minden takarmány- és gabonanövény megsínylette a nagy fokú vízhiányt (Széll és Dévényi, 2008). Ez a magyar gazdaságnak több tízmilliárd forintos veszteséget okozott. A magyar termeszítőknek csupán kis hányada, és csak bizonyos növénykultúrákban tudják megoldani az öntözéses termesztést, mellyel biztosíthatóvá válna a termésmennyiség stabilitása. A paradicsom éves vízigényéhez hazánk területén átlagosan 100 mm csapadékot kellene utánpótolni a gazdáknak. Mindezen károk szárazságtűrő növények használatával, és a megfelelő termesztéstechnológia megválasztásával jelentősen csökkenthetőek volnának (Nyíri, 1997).

3.6. A NÖVÉNYEK KÖZÖTTI KOMPETÍCIÓ

A tudományos stresszélettani kísérletek a vizsgált paramétereket legtöbbször mesterséges körülmények között, optimális feltételek mellett határozzák meg. A termesztésben gyakran nem ilyen feltételek valósulnak meg, a növényekre többféle stressz és az egymással történő versengés hatása (kompetíció) együtt érvényesül. A termesztéshez közeli viszonyok modellezése gazdaságilag fontos, a jövőben feltehetően a mainál nagyobb hangsúlyt kap a stresszélettani kutatásokban.

A növények kompetíciós helyzetben stressz hatására történő viselkedését, esetleges fiziológiai és morfológiai változásait már többen megfigyelték a szakirodalomban (Berendse et al.,

1979; Wilson, 1993; Caldwell et al., 1996). A megfigyelésekből az a következtetés vonható le, hogy a különböző fajú, illetve fajtájú növények adott távolságon belül hatással vannak egymásra.

Egy francia kutatócsoport (Ozier-Lafontaine et al., 1998) kukorica (*Zea mays* L.) és cirok (*Sorghum vulgare* R.) kölcsönhatását vizsgálta. A növények párologtatásának nyomon követésére 4,2 db növényt neveltek négyzetméterenként, kiegyenlített és csökkentett vízellátás mellett. Tapasztalataik szerint a vizsgált növények mért transzpirációja vízhiányos stressz hatására jelentősen lecsökkent.

Zegada-Lizarazu és munkatársai (2005) megfigyelték, hogy kínai bab (*Vigna unguiculata*) és indiai köles (*Pennisetum glaucum*) egymás mellé ültetve az indiai köles vízpotenciálja és fitnessze jelentősen romlott a kontrollhoz képest. Hasonló eredményre jutott köles (*Pennisetum glaucum* ssp. Okashava-1) és tehénborsó (*Vigna unguiculata* ssp. Nakale) együtt ültetése során is, amikor a köles került kompetíciós hátrányba, mely megmutatkozott a levélfelület csökkenésében, illetve a vízpotenciál csökkenésében is, így módon pedig a biomassza csökkenéséhez vezetett (Zegada-Lizarazu et al., 2006).

Ezüstperje (*Corynephorus canescens*) és ezüstös hölgymál (*Hieracium pilosella* L.) egymással versengő helyzetben történő termesztésekor az ezüstperje biomasszája 56%-ra csökkent a külön ültetett kontrollokkal szemben, míg megnövekedett vízellátás mellett a hölgymál került kompetitív hátrányba. Kompetíció alatt a gyökerek alakját és méretét megvizsgálva szintén változásokat tapasztaltak (Weigelt et al., 2005). A gyökereknek a vízért való versengés hatására történő változásáról írtak Aerts és munkatársai 1991-ben, illetve Aerts és Chapin 2000-ben.

A növények között fellépő kölcsönhatások előrejelzésére több modellt is kidolgoztak. A levelek felületére és a termésmennyiségre gyakorolt hatás leírásával foglalkozott Lafontaine és kutatócsoportja (1998), a gyökerek kompetícióját pedig Lafolie és munkatársai modellezték (1999).

3.7. AZ ABSZCIZINSAV NÖVÉNYI HORMON SZEREPE A SZÁRAZSÁGRŰRÉSBEN

Az 1960-as években több független kutatócsoport is vizsgálni kezdte a később abszscizinsavnak (továbbiakban ABA) elnevezett növényi hormont, melynek elsődlegesen a levélleválásban tulajdonítottak szerepet (Oukama et al., 1965). Az ABA magasabbrendű

növényekben a legkülönbözőbb fejlődési fázisokban is kimutatható, számos gombában másodlagos anyagcseretermék. Direkt- (mevalonsavból), vagy indirekt úton keletkezhet a növényben (Erdei, 2004).

Fiziológiai hatása, hogy serkenti a levél leválását, a leválási zóna kialakulását. E mellett szerepe van a rügyek, illetve a magok nyugalmi állapotának kialakulásában, illetve megszűnésében, gátolja a fiziológiailag éretlen magvak csírázását. Mindezek mellett az ABA sietteti az öregedési folyamatokat, serkenti a járulékos gyökérképződést és gátolja a megnyúlásos növekedést. Igen fontos szerepe van a növények vízháztartásának szabályozásában, hiszen a sztóma zárósejtek víztartalmának befolyásolásával szabályozza az elpárologtatott víz mennyiségét, a K^+ , a H^+ és bizonyos szerves anionok mozgását (Pethő, 2003).

Stresszhormon tulajdonsága az aszály-, só-, és hidegtűrésben nyilvánul meg. Az ABA a transpiráció csökkentésével, és a gyökérszövetek vízfelvételének fokozásával regulálja a növény turgorát. Vízhány esetén a mag érését is felgyorsítja (Erdei, 2004).

3.8. A NÖVÉNYTRANSZFORMÁCIÓ LEHETŐSÉGEI

A növények genetikai megváltoztatását, azaz idegen gén bevitelét az 1980-as évek elején sikerült először megoldani. A genetikailag módosított organizmusban a beépülő gén a kromoszómába ékelődve örökletesen megváltoztathatja a növény bizonyos tulajdonságait. Az eredményes növénytranszformációhoz általában szükséges az adott faj szövettenyésztésének megvalósítása, mivel a transzgént általában testi sejtekbe ültetjük be, és a testi sejtből kell növényt regenerálnunk majd felnevelnünk (Dudits, 2003).

A növényi génebézési kutatásban a gén bejuttatás módjait többféleképpen csoportosíthatjuk az alkalmazott technikák, és a felhasznált növényi részek (sejtek, szövetek, szervek) alapján, melyek a génbevitel célpontját képezik. A génbevitel módját tekintve a csoportosítás alapjaként megkülönböztetünk direkt és indirekt transzfer módszereket (Dudits, 2003).

Direkt vagy közvetlen génbejuttatás esetében az idegen DNS molekulát önmagában közvetlenül juttatjuk be a fogadó szervezet sejtjeibe, általában valamilyen fizikai vagy kémiai hatás segítségével. A transzformálni kívánt sejtek ilyenkor lehetnek intakt sejtek, illetve

protoplasztok is. Transzgenikusnak akkor tekintünk egy növényt, ha az idegen gén stabilan integrálódott a növény genomjába (Balázs, 1999).

Az indirekt génbeviteli rendszereknél az idegen gén bejutását egy közbülső organizmus segítségével érjük el. Virális vektor alkalmazásánál főleg a kettősszájú, illetve az egyszájú DNS vírusokat használják a gének átmeneti kifejezésére. *Agrobacterium* fajok vektorként történő felhasználásával működő rendszerek elsősorban kétszikű növények körében alkalmazhatóak stabil transzformánsok létrehozására (Balázs, 1999).

3.9. AZ AGROBACTERIUM MINT TRANSZFORMÁCIÓS VEKTOR

Az *Agrobacterium* nemzetségbe tartozó baktériumok Gram-negatívak, rövid, pálcika alakúak, oxidáz pozitívak, vagyis a glükózt oxidatív úton bontják. Az *Agrobacterium tumefaciens* talajlakó baktérium, gazdanövény köre igen széleskörű, kétszikű növényeket sebzési felületen át fertőz. Hatására gyökérgolyva alakul ki, szőlőn vesszőgolyvát okoz. Több fiziológiai rasszát leírták (Folk, 1993).

A tumor képződésért felelős Ti plazmidot 1974-ben azonosították (Zaenen et al., 1974), melynek transzfer DNS-e épül a növényi genomba. Ezt a szakaszt két oldalról határoló szekvenciák veszik körül. E határszekvenciák között lévő DNS akkor is beépítődik a növény genomjába, ha benne génszabványi eljárásokkal kicserélünk részeket (Miranda et al., 1992).

A T-DNS kivágódásában, illetve a magba való importjában fontos szerepet játszanak a Vir proteinek. Ezek a beépített géndarab orientációját határozzák meg, a hasításokhoz, transzferhez és beépítéshez szükséges enzimfunkciókat elvégzik, miközben a T-DNS-t a nukleáz aktivitásuktól is megvédik (Tinland et al., 1995; Weising et al., 1988).

Az 1980-as években kétféle növénytranszformációra alkalmas vektort fejlesztettek ki. Az egyik fajta vektornál a transzformálni kívánt gént az *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmidjába építették (Fraley et al., 1985). A másik típusnál a T-DNS-t és a Vir géneket külön plazmidba helyezték. Ez utóbbiakat nevezzük bináris vektoroknak (Hoekema et al., 1984). Ezek általában *Escherichia coli* és *Agrobacterium tumefaciens* törzsekben is képesek szaporodni. Praktikusabb használhatóságuk miatt idővel a bináris vektorok kaptak nagyobb szerepet a növényi transzformációs

kísérletekben. A növényi transzformációra használt vektorok szelekciós markergént, határoló szekvenciákat, bakteriális és konjugációs replikációs origókat, és (multi)klónozó helyet tartalmaznak. A modernebb típusokban a klónozást a β -galaktozidázt kódoló lacZ gén α -peptidjének inszerciós inaktivációján alapuló kék-fehér szelekciós rendszer könnyíti meg.

Grimsley és munkatársai az *Agrobacterium* Ti plazmidját vírusvektorként alkalmazva egyszikűek transzformációját is kivitelezhetővé tették (1986).

3.10. PARADICSOM TRANSZFORMÁCIÓ

A szakirodalomban leírt első paradicsom transzformálást Horsch és munkatársai végezték *Agrobacterium tumefaciens* törzs segítségével, dohány dajkakultúrát alkalmazva (1985). Ezt követően McCormic különböző levéldarabokból, illetve szárdarabokból történő növényregenerációt vizsgált (McCormic, 1986). A módszert Fillatti (1987) és Yoder (1988) fejlesztette tovább. A dajkakultúrával végzett transzformáció hatékonyságát befolyásoló tényezőkről Anne Frary számolt be 1996-ban.

Az első dajkakultúra nélküli transzformációt Arrillaga és munkatársai végezték 1998-ban, majd több publikáció is megjelent ezzel a transzformációs módszerrel végzett eredményekről (például Pfitzner et al., 1998).

Manapság a legelterjedtebb technika paradicsomok transzformálására a sziklevek illetve a szik alatti szárrészek transzformációja. Fiatal csíranövények szikleveleit illetve szik alatti szárrészeit *Agrobacterium* kultúrával inkubálják együtt, majd rövid ideig antibiotikum-mentes táptalajon nevelik. Ezután a növényi részeket hormon és antibiotikum tartalmú táptalajra helyezik, majd azon nevelik az első hajtások megjelenéséig. Megközelítőleg másfél hónap leteltével a kis hajtásokat gyökerezést indukáló táptalajra teszik át, majd a meggyökeresedett növényeket földbe ültetve nevelik fel (Earle és Frary, 1996). A módszerek azonban eltérnek mind az alkalmazott táptalajok összetételében, mind a hozzáadott hormonokban. Leggyakrabban MS táptalajon nevelik a növényeket, a növekedés serkentésére zeatint használva a hajtásindukáló médiumhoz (Frary et al. 2001; Park et al., 2003). Több publikáció megjelent azonban a BAP-al (6-benzil amino-purin) kezelt növények transzformáció utáni sikeres felneveléséről is (Szabó és Bánfalvi, 2000).

Az acetosyringon olyan másodlagos anyagcseretermék, mely sebzési felületeken keletkezik a növényekben, baktérium-kultúrához adagolva pedig hozzájárul az *Agrobacterium* fertőzési hatékonyságának növeléséhez (Kátia et al., 1993). A kapott transzformánsok számának emelése érdekében tett nagy lépés volt az *Agrobacterium* inkubálása acetosyringonnal - mintegy felkészítése a fertőzésre - így nagyobb hatékonyságú baktérium-fertőzést értek el (Pfitzner, 1998). A transzformáció hatékonyságát befolyásoló tényezőkkel foglalkoztak Frary és munkatársai (Frary et al. 2001).

Szintén elterjedt módszer a steril növények dekapitálás utáni fertőzése. Ennek során a sziklevelek megjelenése után (kb. 9 napos korban) a levágott (dekapitált) sziklevel alatti szárrészeket (hypocotylokot) baktérium szuszpenzióba mártott steril lapocskával megérintve kezelik. Néhány nap után a szik alatti szárra fecskendezett antibiotikumos oldattal előlik a baktériumokat, majd a megjelenő hajtásokat leválasztják a szárról, és megfelelő táptalajon gyökereztetik (Fári et al. 1993).

Ismert továbbá az irodalomban a lomblevelek transzformációja is, mely során az első kifejlődött leveleket sebzik, és fertőzik *Agrobacterium* szuszpenzióval. A kalluszosodást követően itt is a szelekció, majd a kis növények kiültetése következik (Chunzi et al., 1995). A sziklevel transzformációval szemben ez a transzformálási módszer kevesebb steril növényanyagból kiindulva több fertőzhető paradicsomlevelet ad.

A stressztűrés növelése érdekében történő paradicsom transzformációra több példát is ismerünk az irodalomból. Bird és munkatársai poligalakturonáz beépítésével mechanikai behatásokkal és gombás fertőzésekkel szemben ellenállóbb paradicsomot hoztak létre (Bird et al., 1998). Kathleen Phillips és munkatársai (Phillips et al., 2005) az AVP1 gént túltermeltetve nagyobb és erősebb gyökérzet kialakítását érték el, míg Áine Plant (Plant et al., 1991) a le16 gén és a szárazságtűrés kapcsolatát vizsgálta. Lutfur Rathman 2005-ben publikálta a RUBISCO és a szárazságtűrés kapcsolatáról készült poszterét.

A használt transzformációs módszertől, illetve a genotípustól függően a transzformáció megváltoztathatja a paradicsom ploiditási fokát. Tetraploiditás megjelenése a transzformációtól függően 24-80 %-os is lehet (Ellul et al., 2003).

3.11. A GÉNCSENDESÍTÉS LEHETŐSÉGEI

A géncsendesítés egy szekvencia-specifikus hatás, mely az mRNS stabilitását vagy a transláció mértékét befolyásolja, ugyanakkor érinthet homológ DNS szekvenciákat is. Szinte az összes eukarióta szervezetben működik, így állatokban és gombákban is (Fire et al., 1999, Hammond et al., 2001). Megfigyelések alapján két altípusa különböztethető meg, a transzkripciós géncsendesítés, melynek során a célgénről nem képződik átírt mRNS kópia (Matzke et al., 2004), illetve a poszttranszkripciós géncsendesítés (PTGS), mely a célgénről átíródó mRNS-ek fokozott lebontását eredményezi (Király, 2002).

A PTGS-re egy transzgenikus petúnia növény előállításakor derült fény, amikor a bejuttatott chalcon-szintáz gén az endogén chalcon-szintáz (*Chs*) gén működésképtelenségéhez vezetett (Napoli et al., 1990). A chalcon-szintáz a növényi flavonoid bioszintézis egyik kulcsenzimét kódolja, mely a virág színéért, és egyes antimikrobiális vegyületek termeléséért is felelős. A további vizsgálatok azt igazolták, hogy a jelenséget az mRNS-ek citoplazmában történő lebomlása idézte elő, mely specifikus, és a PTGS jelenségére vezethető vissza (van Blokland et al., 1994).

A géncsendesítés mind a fejlődés genetikai szabályozására, mind a stresszhatások kivédésére (pl vírusfertőzés ellen) hatásos módot nyújt a növényeknek, mechanizmusa egy fontos szabályozási lehetőség a transzkripció során, és utána (Gregory et al., 2008).

3.11.1 A poszttranszkripciós géncsendesítés (PTGS)

A géncsendesítés jelenségének vizsgálata rövid időn belül nagy jelentőséget kapott, mivel a növényekben a véletlenszerű mutások vizsgálata mellett transzgenikus, célzottan funkcióvesztéses mutások előállítását is lehetővé teszi.

A géncsendesítési mechanizmus során a DICER nevű RNáz III típusú enzim kis 21-26 nukleotid hosszú RNS molekulákká, ún. siRNS-ekké darabolja a másodlagos szerkezettel bíró RNS szakaszokat. A növényekben felhalmozódó siRNS-ek beépülnek a PTGS másik effektor komplexébe (RISC) amely az siRNS-ek miatt specifikusan gátolja a vele homológiát mutató RNS

szálak kifejeződését (Brodersen és Voinnet, 2006). Ez a gátlás a célszekvencia specifikus vágásával megy végbe a komplex endonukleáz aktivitása miatt.

Egy PTGS útján csendesített növényi gén fenotípusa vegetatív úton történő szaporítás során megmarad az utódokban is, míg szexuális úton történő öröklődése bizonytalan lehet. Mértéke változhat a növény egyedfejlődése során (Dehio és Schell, 1994), jelentkezése függ a környezeti tényezőktől is (Elmayan és Vaucheret, 1996). A növényi PTGS képes szisztémikusan terjedni a növényben (Palauqui és Vancheret, 1998).

IR PTGS útvonal

A transzgének beépülve gyakran úgy rendeződnek át, hogy átírásukkal spontán dupla szálú RNS-eket (dsRNS) képeznek, melyek beindítják a géncsenedesítő mechanizmust a sejtben (Stam et al., 1997). A csendesítés hatásfoka azonban fokozható, ha úgynevezett „inverted repeat” (IR), azaz fordított ismétlődésű szekvencia kerül beépítésre a növénybe (Waterhouse et al., 1998). A kísérleti tapasztalatok alapján a csendesítés jobb hatásfokú, ha a konstrukció ún. „spacer” régiója egy funkcióképes intront tartalmaz (Wesley, 2001). Az IR PTGS működése a 7. ábrán az „a” pontban látható.

S-PTGS útvonal

Egy értelmes szál (sense) beépítésével is elérhető géncsenedesítés, ha ilyenkor kétszálú RNS képződik a növényi sejtben (Dalmay et al., 2000). Ez esetben az RDR6 RNS függő RNS polimeráz felismeri az abnormális RNS szálát, és kiegészítő szálát szintetizál hozzá. Ez a dsRNS indítja be a géncsenedesítést (Gazzani et al., 2004) (ld. 5. ábra b pontja).

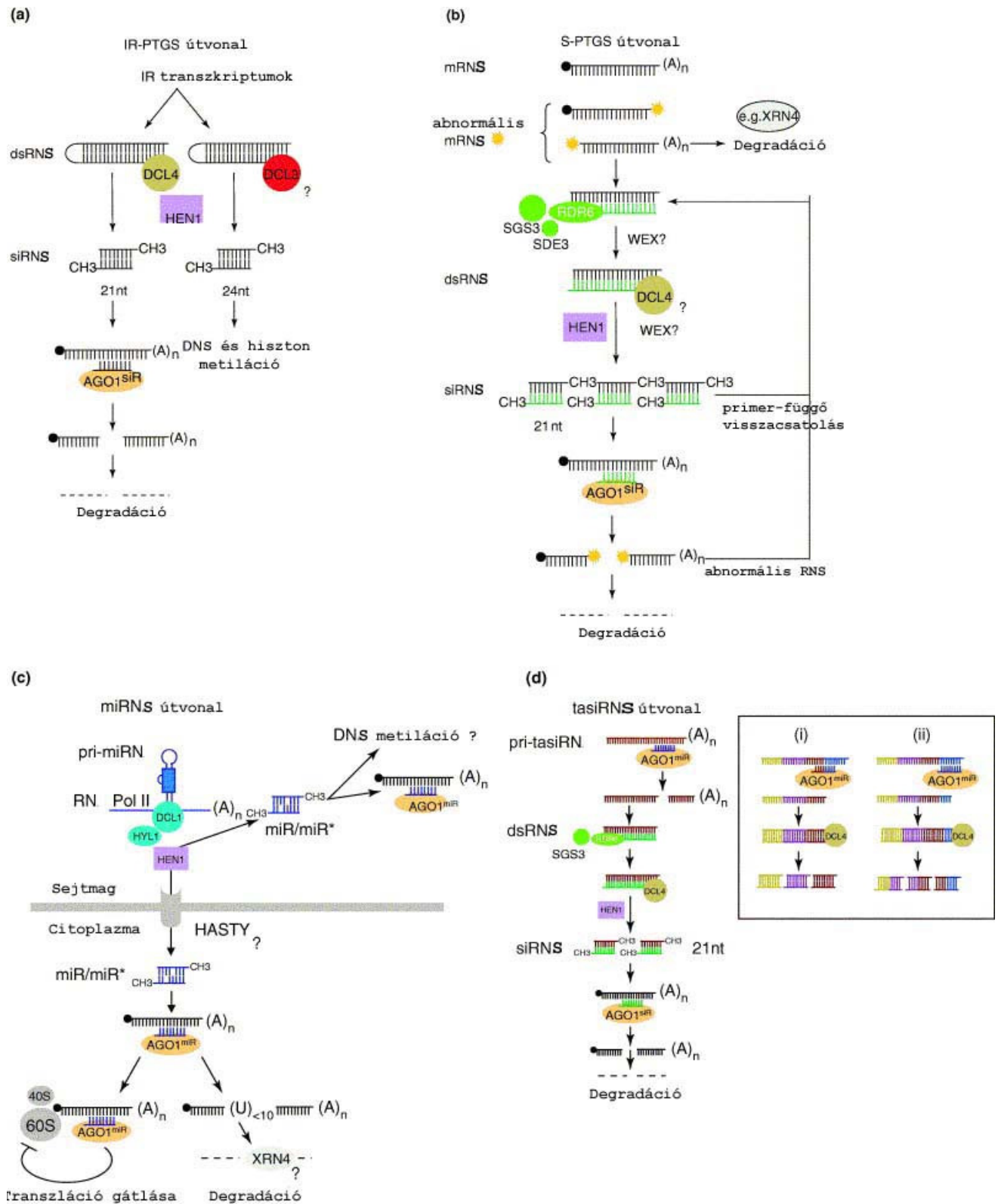
miRNS útvonal

Növényekben a de novo szintetizálódó miRNS-ek 20-24 bázispár nagyságú, egy szálú molekulák, melyek szintén képesek a PTGS beindítására. Hatással vannak a fehérjeszintézisre (Bartel et al., 2004), stresszválaszok szabályozó elemeire (Jones-Rhoades és Bartel, 2004) és transzkripció faktorok akkumulációjára (Aukerman és Sakai, 2003) (ld. 5. ábra c pontja).

tasiRNS útvonal

Az ún. transacting siRNS-ek (tasiRNS-ek, vagy lebonyolító siRNS-ek) funkciójukban a miRNS-ekhez hasonlítanak, a fehérjeszintézisre, a transzkriptumok degradációjára hatnak. Nem

kódozó, egyszálú transzkriptumokból erednek (pri-tasiRNS), melyek duplaszálú RNS-ekké képesek átalakulni, így kiváltva a géncsendesítést (Vazquez et al., 2004) (ld. 5. ábra d pontja).



5. ábra: A poszttranszkripció géncsendesítés (PTGS) különböző típusai (forrás: Brodersen and Voinnet, 2006)

3.12. A POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ HASZNÁLATA TRANSZGÉN JELENLÉTÉNEK KIMUTATÁSÁRA

A genetikailag módosított organizmusok kimutatásának problémája viszonylag új keletű. Az egyik első publikáció a témában egy nagy horderejű felmérés eredményeit taglalja, melyben 29 laboratórium vett részt. Az ő munkájuk nyomán a széles körűen használt 35S promóter és NOS terminátor váltak kimutathatóvá PCR reakció segítségével, de már ebben a munkában is jelentőséget kapott a szennyezések veszélyére való figyelmeztetés (Lipp et al., 1999). Mivel a PCR reakció igen érzékeny, fokozottan ügyelni kell a minták feldolgozásától a reakció összeméréséig minden szennyezési forrásra.

A polimeráz láncreakció (PCR) a DNS-szál in vitro sokszorosítása, melyet Mullis fejlesztett ki, a természetben lejátszódó DNS-replikáció mintájára. Módszerének lényege, hogy a templát DNS-szárról két iniciáló oligonukleotid (azaz primer) és DNS-polimeráz enzim segítségével rövid időn belül számos másolatot készíthetünk. A primerek által közrefogott DNS-szakaszból a DNS-polimeráz enzim másolatokat készít, melyek száma a ciklusok számával exponenciálisan nő (Hajós né 1999).

A ciklusok során a denaturáció, tapadás és a lánchosszabbítás lépéseit egymás után többször ismételni kell, így a jelenlévő összes másolat replikációja megtörténik. Ezzel a technikával tehát pikogrammnyi DNS-ből mikrogrammnyit lehet előállítani pár óra leforgása alatt, ez a mennyiség pedig már elegendő a további vizsgálatokhoz.

Az egyszerű PCR reakció mellett a transzgének kimutatására a tudomány fejlődésével egyre több módszert, egyre nagyobb érzékenységgel alkalmazhatunk. Ezek között említhetjük a Southern hibridizációt, a valós idejű PCR-t, és az ELISA tesztet (Ahmed, 2002). A transzgén mennyiségének kimutatására is alkalmas Real-time PCR-el történő kimutatásról talán a legbővebb az irodalmi említés (Banerjee et al., 2006; Weighardt et al., 2004; Fernandez et al., 2005). A PCR reakció azért terjedt el széleskörűen, mivel gyors, egyszerűen ismételhető, és viszonylag olcsó. Manapság az élelmiszer biztonság érdekében kifejezetten a GMO-k (Genetically Modified Organisms – genetikailag módosított organizmusok) kimutatására szakosodott laboratóriumok működnek országszerte, ahol a szennyező idegen DNS kvantifikálása is fontossá vált.

4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A KÍSÉRLETI NÖVÉNYEK JELLEMZÉSE

Arabidopsis thaliana cv. Columbia *cbp20* mutáns

Az *Arabidopsis cbp20* mutáns levélformája a vad típusú *Arabidopsis*-től eltérően szeldelt. A növény színe kissé zöldebb, felépítése kompaktabb. Fejlődése lassabb mint a vad típusé, a teljes kifejlődés körülbelül 1 héttel tovább tart, ezt korábbi vetéssel kompenzáltuk kísérleteink során. Magszáma eredményeink szerint nem tér el az alapfajtól, csírázóképesége az általunk alkalmazott körülmények között annál valamivel alacsonyabbnak bizonyult. Toleráns a szárazság stresszre (Papp et al. 2004).

Arabidopsis thaliana cv. Columbia *era-1* mutáns

Az *Arabidopsis era-1* mutáns levélformája szeldelt. A növény hasonló termetű mint a vad típusú *Arabidopsis*. A mutáns az ABA jelátvitelben résztvevő farnezil-transzferáz β alegységében hibás működésű. Ennek következtében ABA túlérzékeny, ami mellett fokozottan szárazságtűrő fenotípus jellemzi (Cutler et al., 1996).

Paradicsom (*Lycopersicum esculentum* cv. *Ailsa craig*):

A paradicsom a burgonyafélék családjába tartozó növény, Dél- és Közép-Amerikában őshonos, hosszú tenyészidejű, melegigényes növény. Az *Ailsa craig* folytonnövő paradicsomfajta, mely a genetikai transzformáció gyakori alapanyaga.

4.1.1. *Arabidopsis* növények nevelése

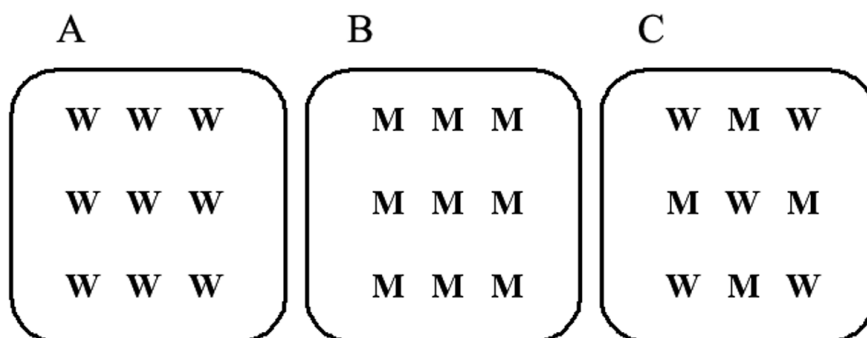
Kísérleteink során az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* és *era-1* mutánsokat vizsgáltuk, melyek kontrolljaként *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia növényt használtunk, mint vad típust.

A növényeket rövidnappalos fényviszonyok mellett neveltük föld – perlit 3:1 arányú keverékében, Conviron növénynevelő kamrában (10 óra fény, 14 óra sötét) négy héten át. Az ötödik héttől hosszú nappalos megvilágítást alkalmaztunk (16 óra fény, 8 óra sötét). A vad típusú növényeket minden alkalommal nyolc hetes korukig neveltük, míg a mutánsokat – lassabb növekedésüket ellensúlyozandó – kilenc hétig, a kezelések megkezdése előtt. A növénynevelő kamrákban kb 65%-os relatív páratartalom mellett 21 °C-os hőmérsékletet biztosítottunk, a fényerősség $120 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ volt.

A vizsgált egyedeket mindig azonos méretű tenyészedényben neveltük, egymással megegyező tömegű talajban.

Ültetés

A kompetíciós kísérletekhez 9 növényt ültettünk egy tenyészedénybe, a 6. ábra szerint. Az élettani paramétereket összehasonlító műszeres méréseket az A és B elrendezés szerint vetett növényeken végeztük.



6. ábra: A mutáns (M) és a vad (W) típusú *Arabidopsis*-ok ültetése

Szárazságstressz és vízutánpótlás

A kísérleti növényeket a mérések kezdetéig normál vízellátottság mellett neveltük. A szárítási kísérlet kezdetén szántóföldi vízkapacitásig locsoltuk be a növényeket, majd a további

vízellátást teljesen megszüntettük, és elkezdtek vizsgálni a különböző élettani paraméterek változását a növények kiszáradása során.

A csökkentett vízutánpótlásos kísérleteknél előkísérletek során megmértük a tenyészedenyek súlyát a szántóföldi vízkapacitásig locsolt növényeknél, majd a kiszáradás során több napon át. Ebből kiszámítottuk az egy tenyészedenyben lévő növények által elpárologtatott víz átlagos napi mennyiségét. Ennek a vízmennyiségnek a felét (kb 40 ml-t) osztottuk 9 felé, mivel 9 növény párologtatott a tenyészedenyben, és ezt adagoltunk naponta egyesével a növények gyökérzete mellé injektálva.

4.1.2. Paradicsom növények nevelése

A magfogásra tartott paradicsom növényeket üvegházi körülmények között virágföldben neveltük a termés kifejlődéséig. A természetes pektin-bevonattól megtisztított magvakat hipóval történő sterilizést követően MS táptalajra vetettük (összetételét ld. Melléklet M/3.), és ott tíz napig neveltük. A megjelenő szikleveleket használtuk fel a transzformációhoz.

4.2. MÓDSZEREK

4.2.1. A HASZNÁLT MŰSZEREK ÁTTEKINTÉSE

A következő táblázatban az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia és *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* illetve *era-1* mutánsokon végzett szárításos, illetve a csökkentett vízutánpótlásos kísérletek során használt műszerek és mérési módszerek összefoglalása látható (1. táblázat).

Vizsgálataink során minden kísérletet 4 alkalommal ismételtünk meg, mindegyiket 10 technikai ismétléssel végeztük. Az eredményeket statisztikai próbákkal analizáltuk, hogy megtudjuk van-e szignifikáns különbség a mért adatok között. Ehhez a Microsoft Office 2007 Excel program statisztikai próbáit használtuk, F próbával ellenőriztük a minták normalitását, és T próbával hasonlítottuk össze a eltérő kezelések hatását különböző szignifikanciaszintek mellett.

1. táblázat: Az *Arabidopsis* növények fitnesszének vizsgálatára használt műszerek és a velük mért paraméterek összefoglaló táblázata

	Mért paraméter	Mérőműszer
Klorofill fluoreszcencia	Φ PSII, qP, Fv/Fm	Hansatech FMS 2.
Fotoszintetikus aktivitás	A	ADC Lci
Termolumineszcencia	TL	Hamamatsu photomultiplier H5701-50
Vízpotenciál	Vízpotenciál [MPa]	Scholander bomba – PMS 610
Földtömeg mérése	tömeg [g]	Gravimetrikus meghatározás

4.2.2. A fotoszintézis mérésére használt műszerek általános jellemzése

A fotoszintetikus paraméterek vizsgálatára használt műszerek gyakran a párologtatás mérésére is alkalmasak (porométer funkció). Ezenél a berendezéseknél a mérőfej kamrájába kell helyezni a mintát, amiben a növény megváltoztatja a gáz összetételét, amit a műszer érzékel. A legelterjedtebb ilyen műszertípus a nyitott gázáramoltatású keringetős mérőműszer. Ez meghatározott összetételű és áramlási sebességű gázt hajt át a mérőkamrán, ahonnan a gáz kijut a levegőbe. A beáramló és kiáramló gáz CO_2 és H_2O koncentrációját infravörös gázanalizátorok mérik. A mért értékekből kiszámítható a növény fotoszintézisének és párologtatásának mértéke, valamint több ezekhez kapcsolódó paraméter.

Több előnye van a nyitott rendszerű műszereknek a zártakkal szemben. Ezek a mért értékekből azonnal származtatják a paramétereket, többféle mérőfejet használhatunk velük, a minták nem sérülnek a mérés folyamán, így ugyanazt a levelet többször is megmérhetjük, mindemellett jól beállítható körülményeket tudunk teremteni a mérőkamrában.

4.2.3. Infra-vörös gáz analízis

Az infravörös gáz analizátorok (IRGA) mérési elve azon alapul, hogy a heteroatomos molekulák, mint a CO_2 , H_2O , NO adott hullámhossz sávban elnyelik az infra-vörös sugárzást. A műszer az áramlásvezető csőben haladó CO_2 és H_2O jelenlétét érzékeli oly módon, hogy a cső egyik végében infra-vörös érzékelő, a másik végében infra-vörös fényforrás van. Ezeknek a molekuláknak a jelenlétében az érzékelőn az azokra jellemző hullámhosszon a koncentrációtól és a cső hosszától függő fényelnyelési érték mérhető. Több típusú IRGA analizátor is elérhető, mi a vizsgálataink során az ADC cég LCi berendezését használtuk (7. ábra).

A növények a környezeti hatásokra viszonylag gyors válaszokat képesek adni. Az infravörös gázanalízissal történő méréseknél nagyon fontos, hogy a lehető legkevésbé változtassuk meg a környezetet, amikor a mérés kezdetén a mérőkamrába helyezzük a növényt. Ezért például a mérés referencia levegő mintáját a berendezés hosszú rúdon át veszi, hogy a kísérletező légzéséből származó CO_2 hatását elkerüljék. Szintén fontos a hőmérséklet jó beállítása, és állandó szinten tartása. A mért fotoszintézis erőssége a mintát érő fényintenzitástól függ. Ezt a műszer érzékeli és regisztrálja. Jól összehasonlítható méréseket állandó fényerősség mellett célszerű végezni. Ezt a mi esetünkben a növénynevelő kamra biztosította, aminek állandó megvilágítása alatt végeztük a méréseket.



7. ábra Az LCi készülék mérőfeje használat közben

Az LCi készülékkel a mérés kb 2 percig tart, ami alatt állandó levegőkeringetést biztosít a kamrába épített ventillátor. A műszer a gázok koncentrációja mellett a hőmérsékletet, a

légnyomást, és a fotoszintetikusan aktív fénysugárzást is méri. A mért értékekből kiszámítja többek között a fotoszintetikus aktivitást (A), a sztómakonduktanciát (G_s), és a levél belső CO_2 koncentrációját (C_i).

4.2.4. A klorofill fluoreszcencia mérésének alapjai

A klorofill fluoreszcencia mérése során a növényi fotoszintetikus rendszerek azon tulajdonságát használjuk ki, mely szerint a fénygyűjtő pigment-rendszerből a bejutó fényenergia három különböző módon távozik. Az egyik a fotokémiai reakciók energiájaként történő hasznosítás, melynek során a klorofilok által elnyelt foton energiája elektront gerjeszt, ami így átadódik a fotokémiai rendszer egyes komponenseinek a PSII-ben, majd a PSI-ben. A beeső fényből felfogott "felesleges" energiát – azaz a reakciócentrumok záródása után megmaradó energiát – kétféle módon sugározhatja ki a növény. A hő formájában történő kibocsátás kevésbé jól mérhető, míg a fény formájában történő energiavesztést könnyen nyomon követhetjük. Ennek hullámhossza ugyanis jellemző, mindig hosszabb a beeső fény hullámhosszánál. A felfogott és a kibocsátott fény hullámhossza közötti különbség megkönnyíti az érzékelést annak ellenére, hogy a klorofill fluoreszcencia mértéke a besugárzott fényhez képest viszonylag kicsi. A besugárzott fény ismeretében a növény által kibocsátott fluoreszcencia jól jellemzi a fotoszintézis működését. Következtetni tudunk a fotoszintetikus apparátus, ezen belül az elektrontranszportlánc működésére, a zárt és nyitott reakciócentrumok arányára, és még sok jellemző értékre. Az új műszerek „modulált” (ki- és bekapcsolt) fényforrást használnak, és az érzékelők a mérőfej által gerjesztett fluoreszcenciát mérik. A kísérlet kezdetén a mért levélfelületet általában sötétadaptálni kell, de bizonyos fluoreszcencia paraméterek megvilágítva, így a terepen napfény mellett is mérhetőek.

A mérés során a mérőfej bekapcsolása és a sötét adaptált minta expozíciója után mérünk egy minimális fluoreszcencia szintet (F_0), majd egy telítő villanófény bezárja a reakciócentrumokat, és így mérhetünk egy F_m értéket. A következő öt percben a műszer fotoszintetikusan aktív fényt bocsát a mintára, és időközönként telítő fényvillanásokat is alkalmaz. Ez utóbbi segítségével határozza meg a fénynek kitett maximális fluoreszcencia értéket (F'_m). Közvetlenül a villanás előtt mérhető az F_i érték.

A PSII hatásfoka a következő képlet segítségével számítható ki:

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_t) / F'_m$$

A Φ_{PSII} megadja a PSII-ben található klorofilok fényelnyelése és a fotokémiai reakciókhoz felhasznált energia arányát, utal a lineáris elektrontraszport (J) mértékére, illetve a fotoszintézis működésére. Normál körülmények között ez az érték összefüggésben van a CO₂-kötés hatásfokával. Mindezen tulajdonságai miatt a Φ_{PSII} alkalmas a fotoszintetikus kapacitás kiszámítására is.

A fotokémiai kioltás (qP) meghatározása a következő képlet alapján történik:

$$qP = (F'_m - F_t) / (F'_m - F'_0)$$

A qP érték utal a nyitott reakciócentrumok arányára, míg 1-qP a zárt reakciócentrumok arányára. Gyakran publikált paraméter az F_v/F_m , mely a PSII valódi teljesítményét jellemzi, ha minden reakciócentrum nyitva van. Kiszámítási módja:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m = \Phi_{PSII} / qP$$

Az F_v/F_m érték változását a nem-fotokémiai kioltás hatásfokának változása is okozza. Ez az érték a legtöbb növényfajnál 0,83 körül optimális.

Az F_0 érték meghatározásához a sötétadaptált növényeket távoli vörös fénynek teszik ki, melynek hullámhossza >680nm körüli. Ez a beépített funkció szintén megtalálható a fluoriméterekben.

A nem-fotokémiai kioltás mérésére a legegyszerűbb módszer az F_m érték változásainak mérése a végső F'_m értékéhez viszonyítva a következő képlet használata:

$$NPQ = (F_m^0 - F_m') / F_m'$$

Az NPQ egyenesen arányos a hőkibocsátással, egy átlagos növénynél, telítő megvilágításnál 0,5 – 3,5 között alakulhat, de ez a növényfajtától és a növény állapotától függően változhat.

FMS2 műszer

A méréseink során alkalmazott műszer (FMS2) egy modulált működésű fluorométer. A konzol és a hozzá csatlakoztatható mérőfej mellett egy akkumulátor egészíti ki, mely szabadföldi mérésekre is alkalmassá teszi. Modulált működésű, tartalmaz egy 594nm hullámhosszú, ki-bekapcsolható fényforrást. Ezen felül egy kettős funkciójú halogén lámpát, aktinikus és villanó funkcióval, valamint két LED fényforrást. Az egyik egy 470nm hullámhosszúságú kék LED, a másik egy 735nm hullámhosszú távoli-vörös a PSI referencia gerjesztéséhez. A mérőfej száloptikával csatlakoztatható a konzolhoz, a mérések során a sötét-adaptációhoz levélklipszeket használunk (8. ábra).



8. ábra Sötét-adaptált mérésekhez használható levélklipsz

A műszer két különböző módon vezérelhető: RS232 csatlakozással Windows operációs rendszerű számítógépről, vagy a konzol irányító billentyűinek segítségével. Számítógépről történő vezérlés során manuálisan irányítható minden fény- és mérési funkció, egy grafikus felhasználó felületen keresztül. A műszer a következő paraméterek mérésére alkalmas:

-sötét-adaptált paraméterek: F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m

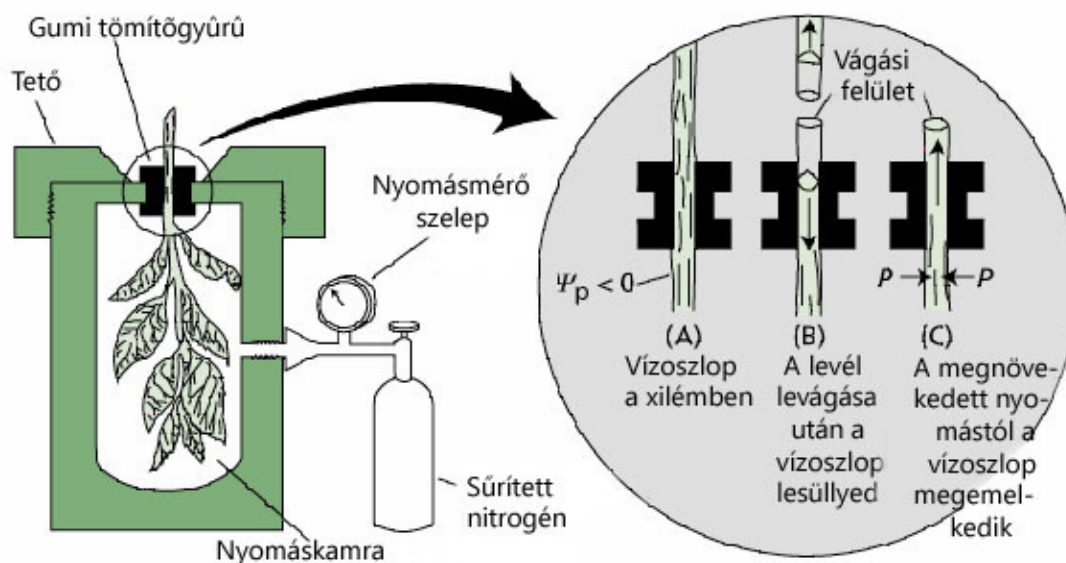
-fény-adaptált paraméterek: F_s , F_m' , F_0' , F_v' , F_v'/F_m' , ϕ_{PSII}

-kioltási koefficiensek: qP , qNP , NPQ

4.2.5. Vízpotenciál mérés Scholander bombával

A levél vagy más leválasztott növényi szerv teljes vízpotenciáljának mérésére az 1960-as évektől kezdődően használják az ún. Scholander bombát. A mérés elve az, hogy a levélre külső nyomást alkalmazunk addig, amíg a levélnyélből az első csepp nedv megjelenését tapasztaljuk. Az ekkor alkalmazott nyomást leolvassuk, ami megegyezik a levél edénnyalábok vízpotenciál értékével.

A mérés során a frissen levágott levéldarab levélnyelét egyenes vágási felszínnel elvágjuk, és a mérőkamrába helyezzük, légmentesen rázárva a kabin tetejét úgy, hogy a növény friss vágási felülete a szabad levegőn legyen. Ezt követően a kamrába sűrített nitrogént vagy levegőt engedünk, és nagyítóval nyomon követjük a nedv megjelenését. A növekvő nyomás hatására megjelenő csepp jelzi, mikor értük el a növény vízpotenciál értékét, ekkor kell leolvasni a gép által jelzett nyomást. A mérés pár percet vesz igénybe, és jól jellemzi a növény vízellátottságát (9. ábra).



9. ábra Scholander bomba (nyomáskamra) vízpotenciálmérő berendezés működési elve

4.2.6. Termolumineszcencia mérésére használt műszer

A méréseket egy laboratóriumi műszer-összeállítással végeztük (Ducruet és Miranda, 1992; Vavilin, 1998; Janda 2000). Egy erősítőhöz csatlakoztatott Hamamatsu H5701-50 photomultiplier készülék detektálta a biolumineszcenciát. A hőmérséklet szabályozásához 4×4 cm-es Peltier elemet (Marlow Instruments, Dallas, Texas, USA) használtunk. A mérést 2 órán át sötét-adaptált növényi mintán végeztük, melyet egy gumigyűrű és Pyrex-ablak szorított neki a lemeznek. $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük a mintákat, miközben egy PAM 102-FR fényforrás távoli-vörös fénnel világította őket. Ezután fél órával kezdtük a mérést, miközben másodpercenként $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -al emeltük a hőmérsékletet.

4.3. AZ EZERMAGTÖMEG, A FRISS ZÖLD TÖMEG ÉS A CSÍRÁZÓKÉPESSÉG MEGHATÁROZÁSA

Vizsgálataink során az ezermagtömeget 3 biológiai- és 3 technikai ismételtsben határoztuk meg. A növények friss zöld tömegét 8 hetes felnőtt növényeken mértük 3 biológiai– és 5 technikai ismételtsel. A csírázóképeesség meghatározására 100 magok vetettünk el, és megszámloltuk a kikelő egyedek számát, 3 biológiai– és 5 technikai ismételtsel.

4.4. GÉNSEBÉSZETI ELJÁRÁSOK

4.4.1. A génkonstrukciók előállításához felhasznált vegyszerek

A kísérletek során használt restrikciós endonukleázokat, T4 DNS-ligázt, Taq-polimerázt, dNTP nukleotidokat, valamint az enzimreakciókhoz és a PCR-ekhez szükséges valamennyi pufferoldatot az MBI Fermentas (Biocenter Kft) szállította.

4.4.2. Az alkalmazott baktériumtörzsek

Az *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) baktérium törzset használtuk fel a génkonstrukciók szelekciójára és szaporítására.

A növénytranszformációhoz *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404-es törzsét használtuk, melyet Dr Gyögyey János bocsájtott rendelkezésünkre.

A baktériumok felszaporításához 2TY táptalajt használtunk (leírását lásd a mellékletben M/3). A baktériumok szelekciójához ampicillin, kanamycin, rifampicin, illetve hygromycin antibiotikumokat alkalmaztunk (SOTE Gyógyszerellátó).

4.4.3 A kísérletek során használt plazmidok

A pBluescript®II pKS plazmid vektort (ampicillin rezisztencia, kék/fehér színszelekció) a Stratagene-től vásároltuk. Növényi vektorként pCAMBIA 1300 plazmidot használtunk (Cambia BioForge) 35S promóter és 35S terminátor elemekkel kiegészítve. E mellett a paradicsom szekvencia elemeket pCP60 jelű bináris vektorba is beépítettük (ld. M/9)

4.4.4. DNS kivonás

A bakteriális plazmid DNS kivonásához a Qiagen Qiaprep Spin Mini Kit®-jét használtuk. A mintákat agaróz gélen futtatva ellenőriztük.

A transzgenikus növények kimutatásához több DNS kivonási módszert kipróbáltunk. Előzetes eredményeink szerint a Qiagen cég DNeasy Plant System Mini Kit DNS-kivonó rendszerét találtuk a legjobbnak (Qiagen 2000), így a továbbiakban munkánk során ezt a módszert alkalmaztuk.

4.4.5. PCR reakció növényi DNS templáton, szekvencia meghatározás

Munkánk során saját tervezésű indítószekvenciákat használtunk (Sigma) (ld. M/2). A reakcióhoz használt enzimet, illetve a PCR egyéb összetevőit a Fermentas-tól (Biocenter) vásároltuk. A PCR termékeket 1,5 %-os agaróz gélen választottuk el (Duchefa) és ethidium-bromiddal festettük meg. Az ellenőrizni kívánt szekvenciákat a Biomi Kft (Gödöllő) segítségével határoztattuk meg.

4.4.6. *Escherichia coli* és *Agrobacterium tumefaciens* transzformálása

A baktériumok transzformálására az úgynevezett hősokk módszert alkalmaztuk. Ennek során *Escherichia coli* baktériumot 50mM CaCl₂ oldatban mostunk, majd inkubáltunk. Az így

készült 50 µl kompetens sejthez steril körülmények között 2 µl plazmidot adtunk. Óvatos keverést követően a mintát 30 percig jégen tartottuk, majd 2 percre 42 °C-os hőszokknak tettük ki. Ezt követően 5 percre visszahelyeztük jégbe a baktériumot, és steril kémcsőbe 1 ml folyékony 2TY táptalajt öntöttünk rá. Egy órán át rázattuk 37 °C-on 150 rpm-en, majd az oldatot LB szilárd táptalajra szélesztettük, mely a plazmidra specifikus antibiotikumot tartalmaz és 37 °C-on neveltük. A lemezen az antibiotikumnak köszönhetően csak azok az *Escherichia coli* baktériumok alkotnak telepeket, melyek tartalmazták a transzformált plazmidot, és annak révén kifejezik az antibiotikum-rezisztenciát.

A transzformáció az *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzs esetében is hasonlóan zajlik, 37°C helyett 30°C-os inkubálást alkalmazva (részletesebben ld. M/4-5.).

4.4.7. Paradicsom és burgonya géncsendesítő konstrukció készítése

Az *Arabidopsis CBP20* gén homológját paradicsomban a BLAST program segítségével kerestük ki az adatbázisból. Az *CBP20* génnel 78%-os homológiát mutatnak a paradicsom TC171884 és TC187934 jelű átfedő EST-k (Expressed Sequence Tags – kifejeződő géndarabok, cDNS szekvenciák). Ezekre a szekvenciákra olyan primerpárokat terveztünk, amelyek géncsendesítő konstrukció létrehozására alkalmas génszakaszokat emelnek ki a génből (LeCBP1 és LeCBP2, LeCBP3 és LeCBP4 szekvenciaadatokat ld. M/2). Fiatal paradicsomnövényből (Ailsa Craig fajta) RNeasy (Qiagen) kit segítségével RNS-t tisztítottunk, erről reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-t készítettünk. A fenti primerekkel kiemelt paradicsom géndarabokat pKS II (Stratagene) vektorba klónozva, azokból fordított ismétlődésű konstrukciót állítottunk elő. Ezt a 35S promótert és növényi terminátor régiót tartalmazó pCAMBIA1300 illetve pCP60 bináris vektorokba klónoztuk át.

Burgonya EST szekvenciákat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a paradicsomban talált szekvenciák 100%-os homológiát mutatnak a burgonya Stu.3353 jelű génjével. Ugyanez a csendesítő konstrukció tehát burgonyában is alkalmazhatónak tűnt.

4.4.8. Rizs géncsendesítő konstrukció készítése

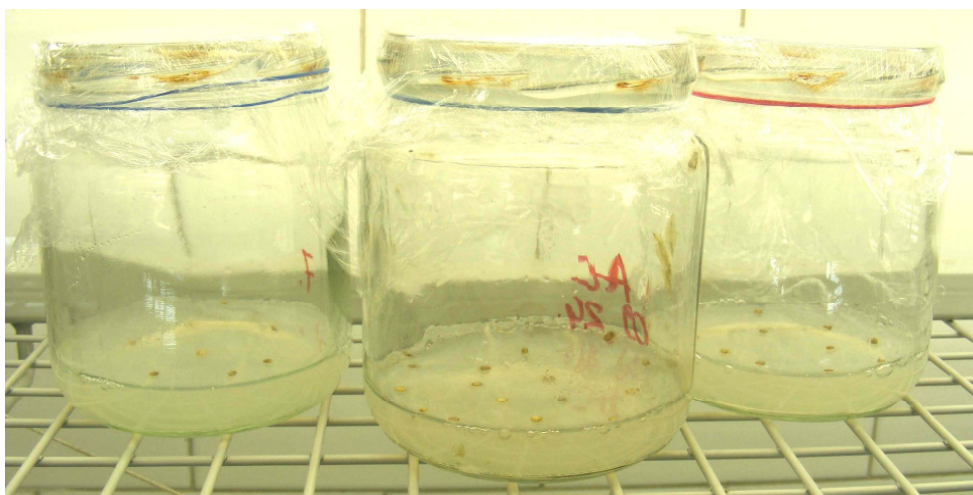
Munkánk során az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *CBP20* génjét BLAST adatbázisban vetettük össze a rizs genomjával, homológ szekvenciát keresve. Az *in silico* vizsgálat szerint a *CBP20* gén ortológja a rizsben az Os02g39890 jelű szekvencia lehet. Ennek csendesítésére fordított hajtű struktúrájú génkonstrukciót terveztünk.

A rizs Os02g39890 gén egyik darabját a genomból Cr1-Cr2 indítószekvenciákkal PCR reakciót használva emeltük ki. A gén ezzel átfedő másik részét Cr5 illetve Cr6 indítószekvenciákkal amplifikáltuk (az indítószekvenciák szekvenciaadatait ld. M/2). Az így kapott PCR termékeket GFX oszloppal (GE Healthcare) tisztítottuk, majd pKSII vektorba klónoztuk. Alkalmas restrikciós hasítási helyek segítségével a klónozott darabokból egy intron spacert is tartalmazó fordított ismétlődésű konstrukció volt összeállítható, melyet egy 35S promótert és növényi terminátor régiót tartalmazó pCAMBIA1300 bináris vektorokba helyeztünk át.

4.5. PARADICSOM TRANSZFORMÁCIÓ

4.5.1. Steril magvetés

Munkánk első lépéseként Ailsa Craig fajtájú paradicsom magokat sterilizáltunk 5%-os HYPO oldattal, 0,01% Tween 20 detergens jelenlétében 10 percen át. Ezután a magokat steril desztillált vízzel 3x átöblítettük, majd cukrot nem tartalmazó szilárd MS táptalajra vetettük, egy kis méretű befőttes üvegbe (lásd 10. ábra).

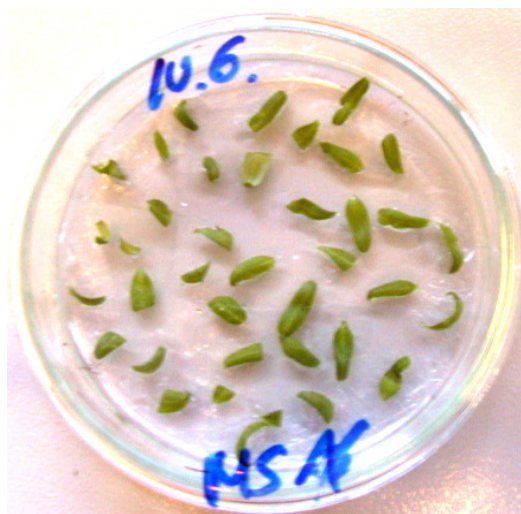


10. ábra: Steril paradicsom magok MS táptalajra vetve

A paradicsom csíranövényeket 9 napig neveltük ilyen körülmények között.

4.5.2. Sziklevél transzformáció

A vetéstől számított 10. napon a magokból fejlődő kis növények szikleveleit egy éles szike segítségével eltávolítottuk, és óvatosan beirdaltuk. Ezeket a leveleket egy új táptalajra, MS1-re helyeztük (összetételét ld. M/3) a következő 2 napra.



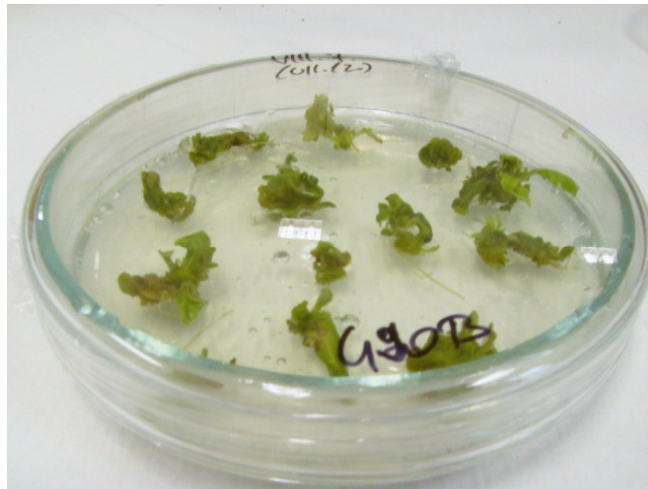
11. ábra: A paradicsom sziklevelek közvetlenül az *Agrobacterium*-mal történő fertőzés előtt

A növényi genomba beépíteni kívánt konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 kultúrát indítottunk 20 ml folyékony 2TY táptalajban, és két napig 30 °C-on ráztuk 150 rpm sebességgel. Ezt követően lecentrifugáltuk a baktérium-oldatot, majd egy inkubációs táptalajban oldottuk fel ismét, mely jobban elősegíti a baktérium fertőzőképességét, mivel acetosyringont is tartalmaz (ld. M/3). Ebben a táptalajban ráztuk a baktériumot 30 °C-on 150 rpm sebességgel rövid ideig, majd 8000 rpm-el lecentrifugáltuk. A baktériumot 3%-os cukortartalmú MS táptalajban (ld. M/3) oldottuk addig hígítva, míg OD₆₀₀ értéke elérte a 0,1-t.

Az MS1 táptalajon lévő szikleveleket ebbe a híg baktérium-tenyészetbe tettük, és együtt ráztuk több órán át, majd steril szűrőpapírra leitattuk a felesleges nedvességet a levelekről, és visszatettük az MS1 táptalajra. Két napig együtt neveltük a növényeket és az *Agrobacterium*ot, majd szelektív táptalajra helyeztük át a szikleveleket, mely a baktérium elpusztítására Claforan antibiotikumot tartalmazott (ld. M/3) (11. ábra). Egy hét múlva másik táptalajra helyeztük a növényi részeket, amely már Kanamycint is tartalmazott, így a szelekciós nyomás miatt a nem transzformált növényi sejtek fokozatosan elhaltak.

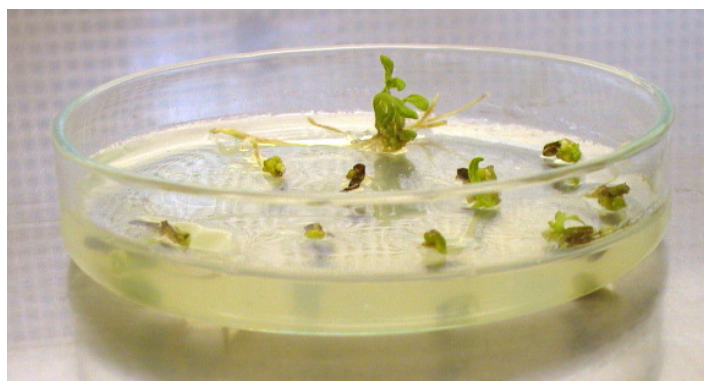
Pár hét elteltével a leveleken kallusz jelent meg, majd kis növényeket sikerült regenerálni (12. ábra). A további *in vitro* munka során különböző hormonösszetételű táptalajokat használtunk a növények igényeinek megfelelően. A hajtástengellyel nem rendelkező, vélt transzformánsoknál

1 hetes gibberellin-kezelést alkalmaztunk, míg a gyökeret nem fejlesztő növénykezdeményeket átmenetileg (1-2 hétre) hormonmentes táptalajon neveltük.



12. ábra: A kalluszokból a sziklevel transzformációt követően kifejlődő paradicsom növények

A gyökeresedési fázisba lépve a növények auxin tartalmú táptalajra kerültek, ahol 1-2 hét alatt kifejlődtek azok a gyökerek(13. ábra), melyekkel a növények képessé váltak az üvegházi körülmények közötti életre.



13. ábra: Sziklevel *Agrobacterium*os transzformálása után kifejlődött vélt transzformáns paradicsom növény

Az üvegházi kiültetés során a növényeket kisméretű cserépbe ültettük, és 4-5 napig átlátszó fóliával takartuk a megfelelő páratartalom fenntartása céljából. Gondoskodtunk a folyamatos

vízellátásról. A kiültetést követő 8. héttől megkezdjük a tápoldatos locsolást is a palánták gyorsabb fejlődése érdekében.

4.5.3. Levél transzformáció

A paradicsom levél transzformáció során szintén steril körülmények között vetett Ailsa Craig fajtájú paradicsomot használtunk fel, ennél a módszernél azonban legalább 2 hétig kellett nevelni a kikelő növényeket fényszobában. A kifejlődő lombleveleket levágva ennél a módszernél 4 levelet tudtunk használni növényenként.

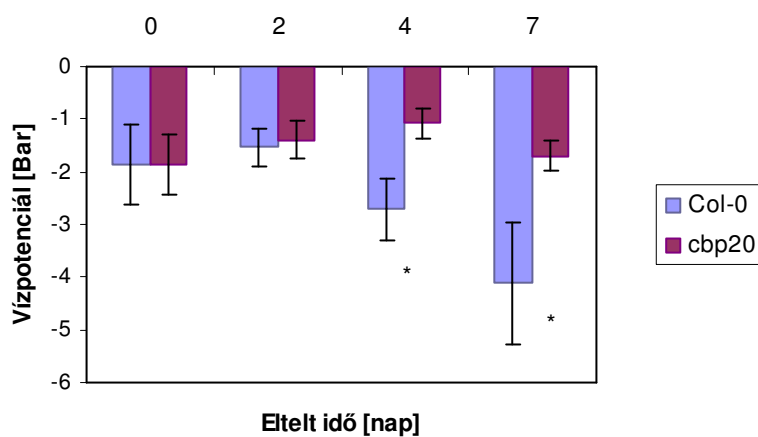
A leveleket a főér mentén több helyen bevagdostuk, és MS táptalajra helyeztük a fonákkal lefelé. Két nap múlva a fertőzést a szikleveél transzformációnál részletezett módon végeztük, és a levéldarabokat a későbbiekben is az előzőekben leírt táptalajokon neveltük (ld. M/3).

A meggyökeresedett vélt transzformáns növényeket üvegházba ültettük ki.

5. EREDMÉNYEK

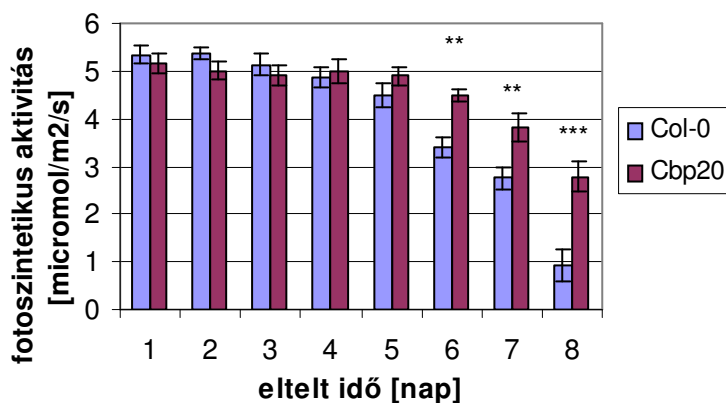
5.1. *ARABIDOPSIS THALIANA* CV. COLUMBIA VAD FAJ ÉS A *cbp20* MUTÁNS FITNESS PARAMÉTEREK MŰSZERES VIZSGÁLATAI

A föld és perlit keverékébe ültetett lúdfű növényeket felneveltük, majd teljes vízmegvonással szárazságstressznek tettük ki őket. A növények kezdeti vízpotenciál értékei szignifikánsan nem tértek el egymástól, a vízutánpótlás megszüntetése után jelentős különbséget a negyedik, illetve az ötödik naptól érzékelünk a kontroll (vad típusú) és a *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növények között. A mutáns növények vízpotenciálja a kísérlet végéig nem mutatott jelentős csökkenést a kezdeti értékhez képest, míg a vad típusú növények esetében a vízpotenciál értékek -5 Bar értékig is visszaestek (14. ábra). Ezt a műszeres mérést vizuálisan is nyomon követhettük, mivel az ötödik naptól szabad szemmel is láthatóvá vált a vad típusú növények turgorvesztése, ami a mutáns növényeken nem volt megfigyelhető.



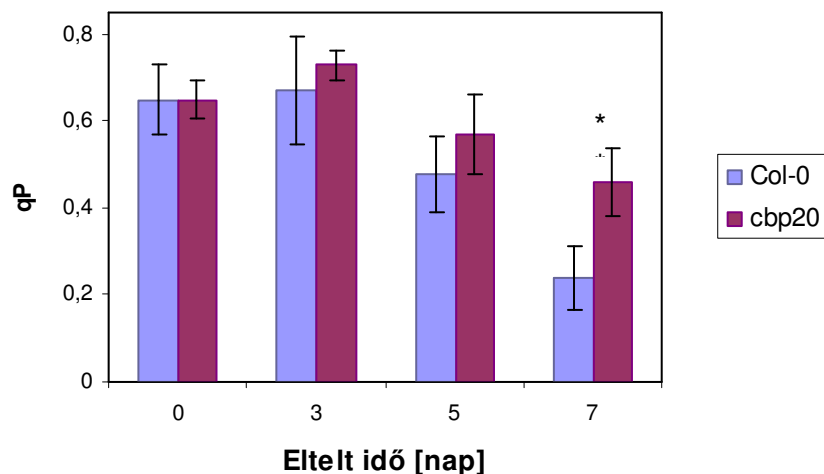
14. ábra Vízpotenciál értékek alakulása a mutáns (*cbp20*) és vad (*Col-0*) típusú *Arabidopsis* növényekben szárazságstressz hatására (a * -gal jelölt adatsorok között $p < 0,5$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

A mutáns és kontroll növények fotoszintetikus aktivitását LCI készülékkel követtük nyomon. Jól öntözött állapotban nem volt megfigyelhető jelentős különbség a növények között, szárazság hatására azonban a hatodik naptól kezdve a mutáns fotoszintézise jelentősen aktívabb maradt a vad típusnál, bár a mutánsban is megfigyelhető volt az aktivitás fokozatos csökkenése (ld.15. ábra)



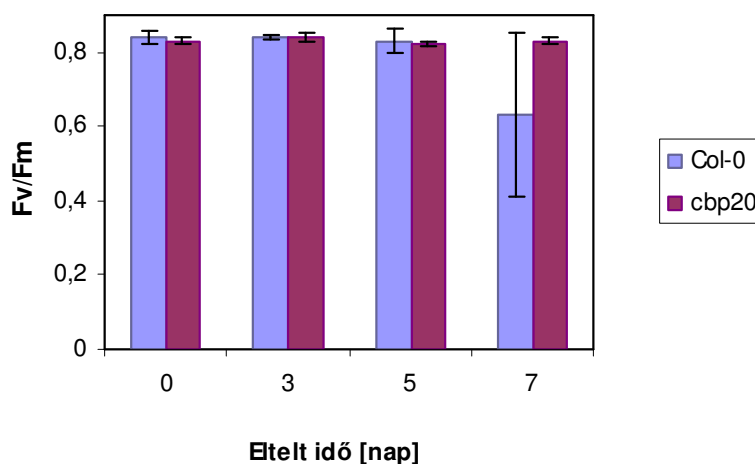
15. ábra Fotoszintetikus aktivitás alakulása a mutáns (*cbp20*) és vad (*Col-0*) típusú *Arabidopsis* növényekben szárazságstressz hatására (a ** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,1$ szignifikanciaszint mellett, a ***-al jelöltekénél $p < 0,01$ szignifikancia mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

A fotokémiai kioltás FMSII műszerrel mérve a kontroll (vad típusú) és mutáns mintákban is csökkent a harmadik naptól kezdve, a csökkenés azonban a kontroll növények esetében jóval jelentősebb lett a kísérlet végére. Szignifikáns különbséget azonban csak a hetedik napon tudtunk mérni (ld .16. ábra).



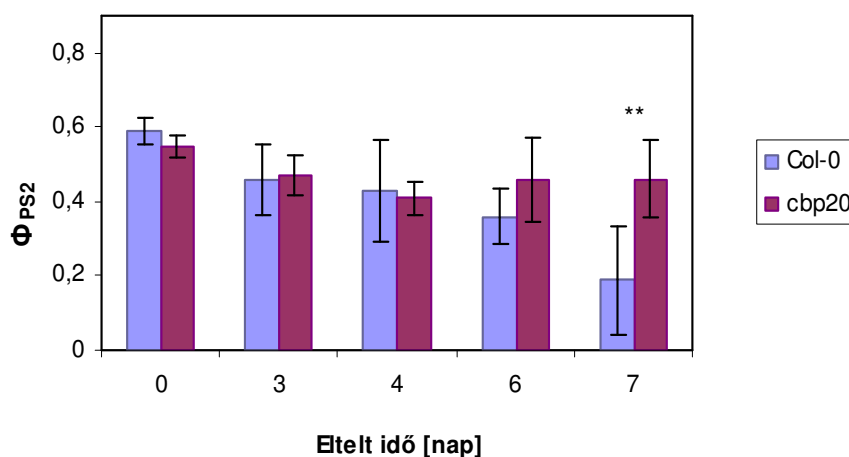
16. ábra Fotokémiai kioltás alakulása a mutáns (*cbp20*) és vad (*Col-0*) típusú *Arabidopsis* növényekben szárazságstressz hatására (a * -gal jelölt adatsorok között $p < 0,5$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

Az F_v/F_m érték fontos mutatója a fotoszintetikus rendszer működésének, azonban kísérleteink során mértéke csak a kontroll növényeknél, és csak erős szárazságstressz következtében csökkent mérhetően. A szárazságstressz korai hatásainak kimutatására nem volt alkalmas (17. ábra).



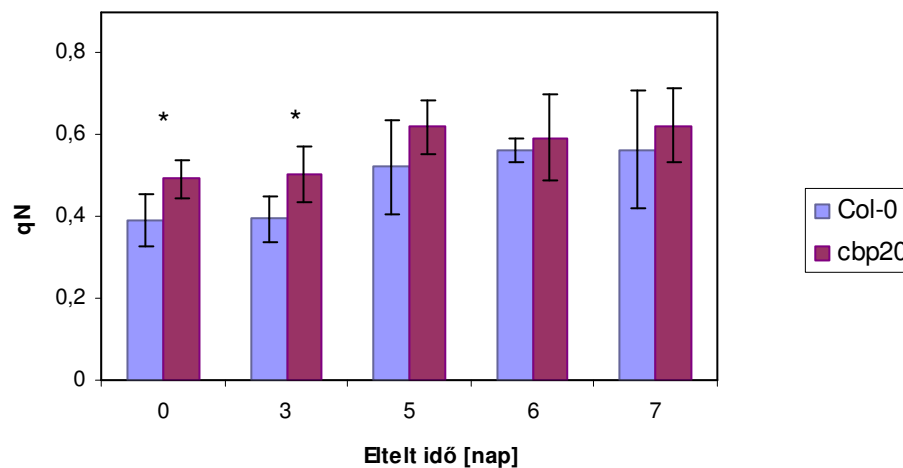
17. ábra F_v/F_m érték alakulása a mutáns (*cbp20*) és vad (*Col-0*) típusú *Arabidopsis* növényekben szárazságstressz hatására

A Φ_{PSII} paraméter a mérés ötödik napjától kezdett különbséget mutatni a két minta között, azonban a mérések nagy szórása miatt ez a paraméter nem bizonyult elég megbízhatónak. Statisztikailag értékelve az eredményeket azt találtuk, hogy csak a hetedik napon mérhető igazi különbség a Φ_{PSII} paraméterben a vad típusú lúdfű, illetve a *cbp20* mutáns lúdfű között (18. ábra).



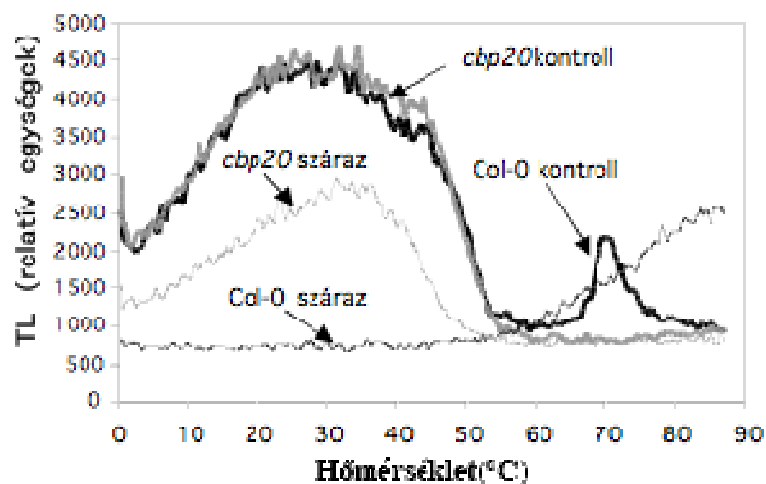
18. ábra: A Φ_{PSII} paraméter alakulása a mutáns (*cbp20*) és vad (Col-0) típusú *Arabidopsis* növényekben szárazságstressz hatására (a ** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,1$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

A nem-fotokémiai kioltás a mutáns növényekben a kezdeti állapottól magasabb értéket mutatott mint a kontroll esetében. Ezek az értékek a szárazság hatására mindkét mintánál a negyedik, ötödik naptól kezdve emelkedni kezdtek. A vad típusú lúdfű a hatodik naptól kezdve mutatott egyezést a *cbp20* mutáns lúdfűvel a nem-fotokémiai kioltás tekintetében, azaz bizonyos szárazságstressz hatására – melyre a hatodik napon jutott el a növény – már a mutánssal egyenlő mértékben reagált ez a fotoszisztémát jellemző paraméter (ld. 19. ábra).



19.ábra A nem-fotokémiai kioltás alakulása a mutáns (*cbp20*) és vad (*Col-0*) típusú *Arabidopsis* növényekben szárazságstressz hatására (a * -gal jelölt adatsorok között $p < 0,5$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

Termolumineszcencia paramétereket is rögzítettünk a Hammatsu photomultiplier mérőfejjel ellátott, egyénileg összeállított műszer segítségével. A növények termolumineszcencia értékét megmértük a vízmegvonást megelőzően, optimális körülmények között, illetve stressznek kitett növények esetében. A távoli vörös fénnel gerjesztett termolumineszcencia (TL) görbék vad típusú (*Col-0*; fekete vonalak) és *cpb20* mutáns (szürke vonalak) *Arabidopsis* növényekben a 9 napos szárazságstressz előtt (vastag vonalak) nem mutattak jelentős eltérést a két kísérleti anyag között. A vízmegvonást követően (vékony vonalak) a *cbp20* mutáns TL görbéje 3000 egység körül mutatta a maximumát, ami 1500 egységgel kevesebb volt, mint normál vízellátottság mellett. A vad típusú lúdfű viszont még ennél is nagyobb visszaesést mutatott, egy viszonylag lineáris jelet kaptunk, mely 800 TL egység körül mozgott (ld. 20. ábra).



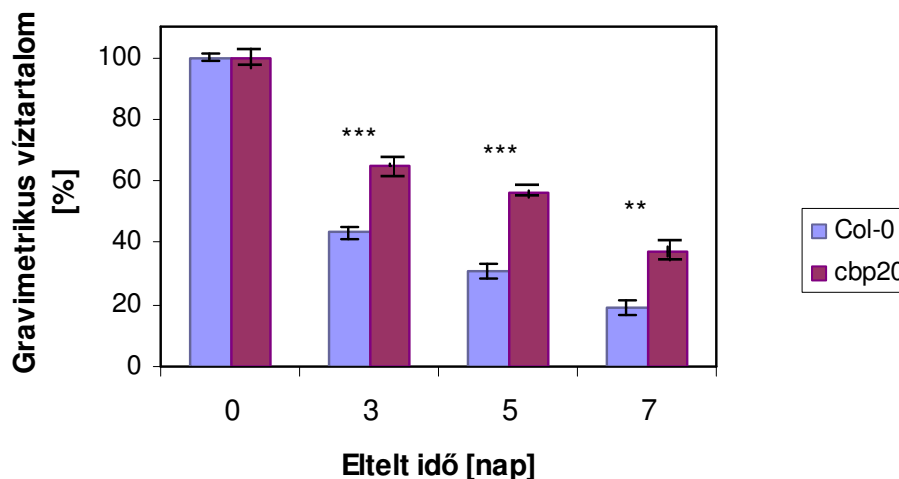
20. ábra Termolumineszcencia alakulása a mutáns (*cbp20* kontroll) és vad típusú (*Col-0* kontroll) *Arabidopsis* növényekben normál vízellátottság mellett, valamint mutáns (*cbp20* száraz) és vad típusú (*Col-0* száraz) növényekben 9 napos vízmegvonásos időszak végén

A föld gravimetrikus víztartalmát (GWC) a mért szántóföldi vízkapacitásból, a naponta mért földsúlyokból és a teljesen kiszáritott földtömegből a következőképpen határoztuk meg:

$$\text{GWC (\%)} = [(W - DW) / (FW - DW)] \times 100$$

Ahol: W – naponta mért földsúlyok, DW – teljesen kiszáritott föld súlya, FW – földsúlyok szántóföldi vízkapacitásnál

A mért értékek már három nap elteltével jelentős különbséget mutattak a kontroll és mutáns növények földjének súlya között, a mutáns növények földsúlya kisebb mértékben csökkent mint a vad típusú kontroll növényeké (21. ábra).

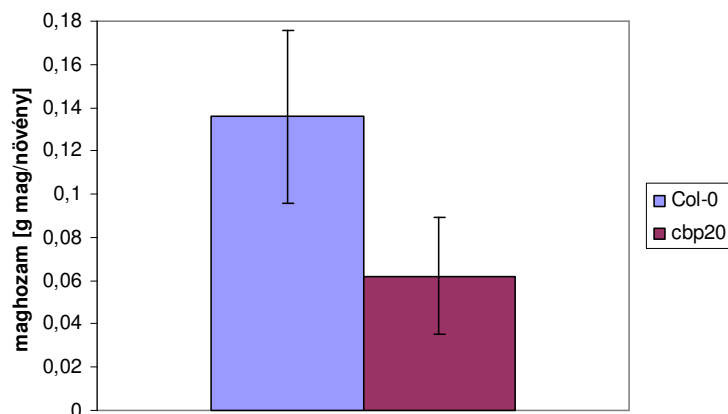


21. ábra Gravimetrikus víztartalom alakulása a mutáns (*cbp20*) és vad (*Col-0*) típusú *Arabidopsis* növényekben szárazságstressz alatt (a ** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,1$ szignifikanciaszint mellett, a ***- al jelöltekénél $p < 0,01$ szignifikancia mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

5.2. AZ *ARABIDOPSIS THALIANA* *cbp20* MUTÁNS ÉS A VAD FAJTA MAGHOZAMÁNAK, EZERMAG TÖMEGÉNEK, FRISS SÚLYÁNAK ÉS CSÍRÁZÓKÉPESSÉGÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

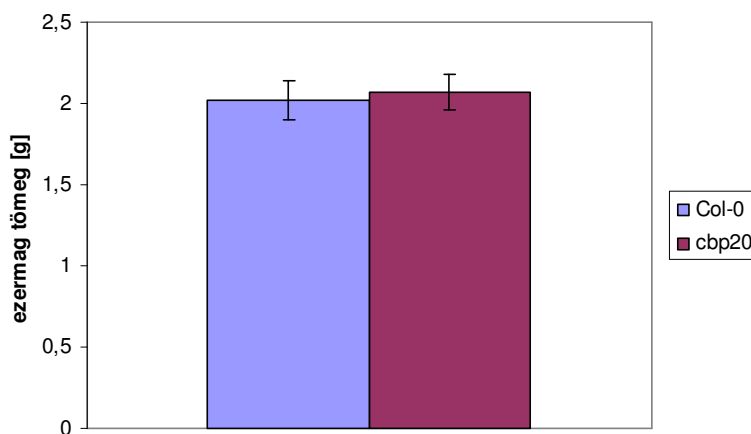
Hogy megállapítsuk, okoz-e az általunk vizsgált *cbp20* mutáció bármilyen változást a termésmennyiség, illetve egyéb hozamértékmérő tulajdonságok alakulásában, összehasonlítottuk a vad típusú *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia vad típusú (*Col-0*) illetve az *Arabidopsis thaliana* *cbp 20* mutáns magvak ilyen tulajdonságait.

A növények maghozamának összehasonlítására több egyed maghozamát megmértük, melyet a 24. ábrán tüntettük fel. Az adatokból jól látszik, hogy a vad típusú növények maghozama meghaladta a mutáns növények maghozamát, bár a mért értékek szórása is jóval magasabb volt (22. ábra).



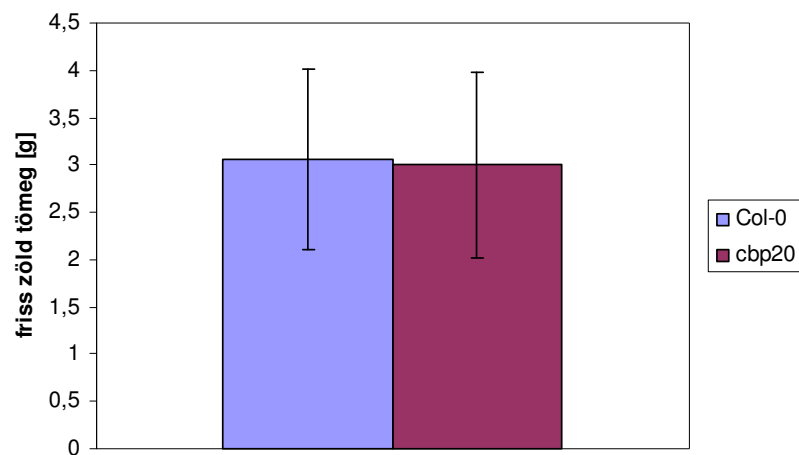
22. ábra: Col-0 vad típus, és *cbp20* mutáns *Arabidopsis thaliana* növények maghozama [g mag/növény]

Az ezermag tömegeket figyelembe véve nem találtunk különbséget a vad típusú (Col-0), illetve a mutáns (*cbp20*) növények között. (ld. 23. ábra)



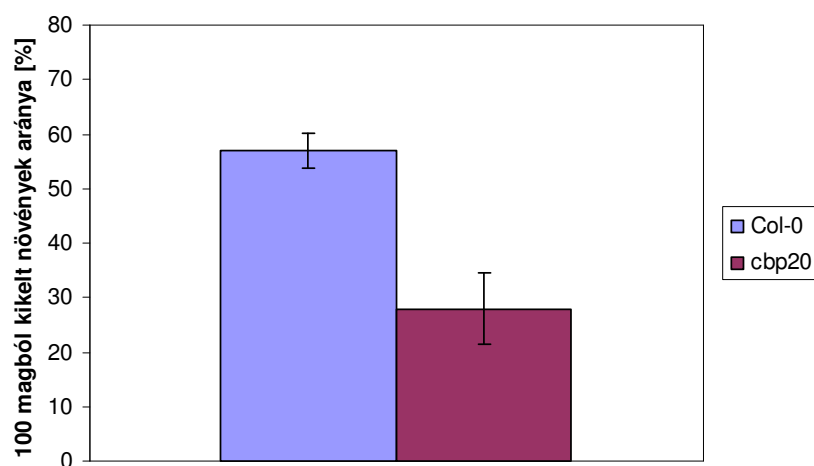
23. ábra: Col-0 vad típus, és *cbp20* mutáns *Arabidopsis thaliana* növények ezermag tömege [g/1000 db mag]

A földtől megtisztított növények friss zöld tömegét a 24. ábrán foglaltuk össze. Ebből jól látszik, hogy nem tapasztaltunk jelentős különbséget a vad típusú (Col-0), és a mutáns növények (*cbp20*) között (26. ábra).



24. ábra: Col-0 vad típus, és *cbp20* mutáns *Arabidopsis thaliana* növények friss zöldtömege [g/növény]

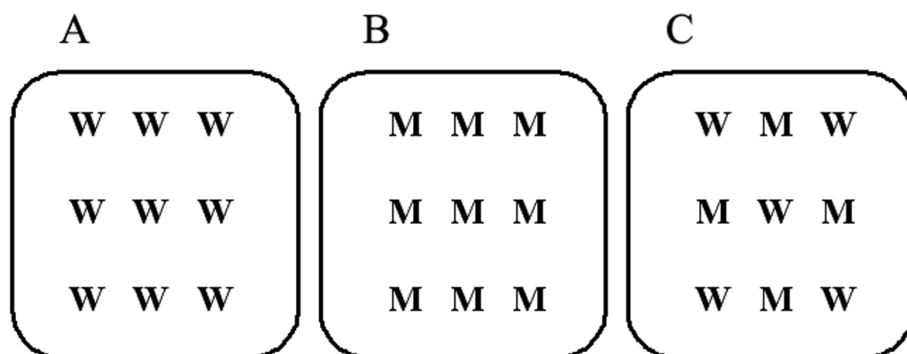
Vizsgáltuk a 100 magból kicsírázó növények számát is, melyet a 25. ábrán tüntettünk fel. Ezen mintáknál különbséget találtunk a mutáns (*cbp20*), illetve a vad típusú (Col-0) növények csírázási aránya között. Míg a vad típusú növények átlag 57%-a csírázott ki kísérleti körülményeink között, addig a *cbp20* mutáns növényeknek mindössze a 28%-a.



25. ábra: 100 magból kikelt növények aránya Col-0 vad típus, és *cbp20* mutáns *Arabidopsis thaliana* esetében

5.3. *ARABIDOPSIS THALIANA* cv. COLUMBIA ÉS *cbp20* MUTÁNS VIZSGÁLATAI A NÖVÉNYEK VEGYES ÜLTETÉSE ESETÉN

5.3.1. *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia és *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* mutáns vizsgálatai a növények egymással versengő helyzetében vízmegvonás mellett



26. ábra: A mutáns (M) és a vad (W) típusú *Arabidopsis* növények ültetése a növények közötti kompetíciót vizsgáló kísérletekben

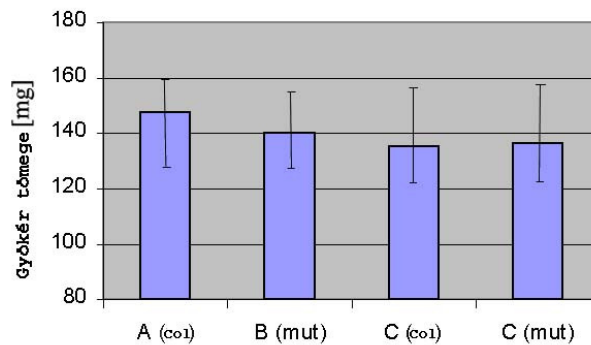
A kísérlet során 9 növényt ültettünk egy tenyészedénybe, átlagosan 6,5 cm távolságra egymástól, azonos tömegű talajkeverékbe (26. és 27. ábrák).



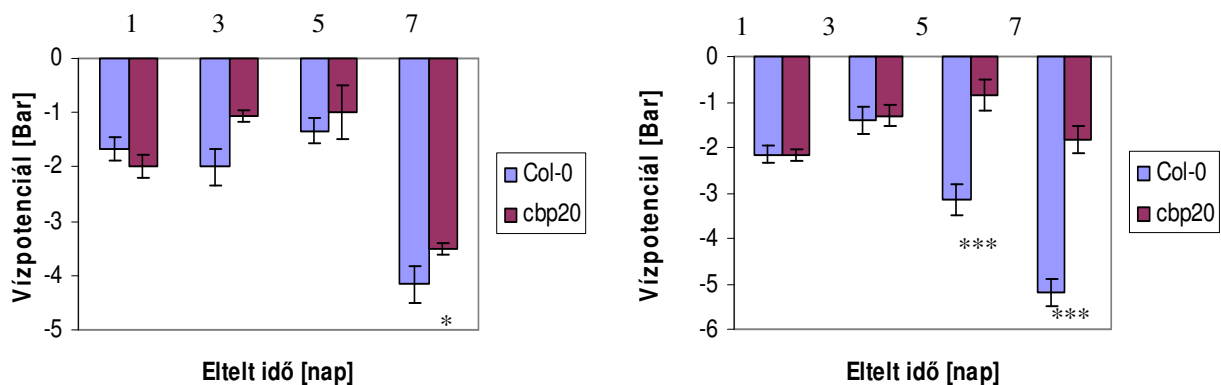
27. ábra: *cbp20* mutáns (9 hetes) (A) és vad típusú (8 hetes) (B) *Arabidopsis* növények külön külön tenyészedénybe (A és B), illetve közös tenyészedénybe ültetve (C) (sárga csillagok jelölik a mutáns növényeket) 8 napos vízmegvonás után

A felnőtt növényeket 8 napig szárazságstressznek tettük ki, és vizsgáltuk a növények stressztűréssel kapcsolatos élettani tulajdonságait. Az előzőekben leírt eredményekkel egybehangzóan külön tenyészedénybe ültetve és felnevelve, nyolc nap szárazságstressz után a vad típusú növények kiszáradtak, míg a mutánsok jelentősen zöldebbek, turgeszcensebbek maradtak.

A növények gyökerének tömegét mérve megállapíthatjuk, hogy lényeges különbség nem mutatkozott a vad típusú, illetve a mutáns növények között (ld. 28. ábra).



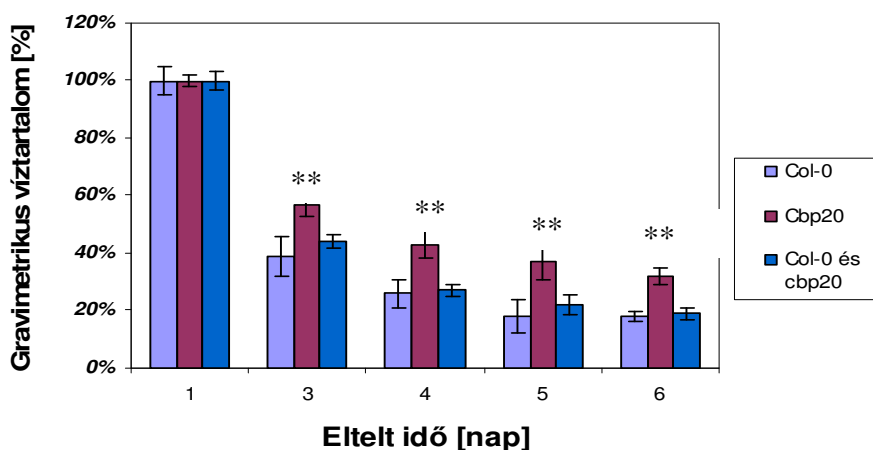
28. ábra: Külön tenyészedényben nevelt vad típusú (A (col)), és mutáns (B (mut)) *Arabidopsis* növények illetve egy tenyészedényben, közös közegben nevelt vad típusú (C (col)), és mutáns (C (mut)) *Arabidopsis* növények gyökértömegei.



29. ábra: Vízpotenciál alakulása vad típusú (Col-0) és *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növényekben, azokat közös tenyészedénybe ültetve (bal oldalon), illetve külön tenyészedénybe ültetve 7 napos vízmegvonás során (a * -gal jelölt adatsorok között $p < 0,5$ szignifikanciaszint mellett, a ***-al jelölt adatsorok között $p < 0,01$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

Amikor külön tenyészedényben neveltük a vad típusú és a *cbp20* mutáns *Arabidopsis*-okat az előzőekkel egybehangzóan azt tapasztaltuk, hogy a mutánsok lassabban veszítettek vizet, így lassabban is száradtak ki mint a vad típusú növények (ld. 27. ábra). A közös tenyészedényben nevelt növények esetében viszont a hervadás látható jelei egyszerre jelentkeztek. A mért paraméterek közül itt a vízpotenciál értékek mindkét növényvonalban hasonló mértékben csökkentek a szárazságstressz előrehaladtával. (ld 29. ábra)

A külön illetve közös tenyészedényben nevelt növények talajának vízvesztését gravimetrián is nyomon követtük. Ennek során a mutáns növényeket tartalmazó talajkeverék bizonyult a vízmegvonásos időszak végéig a legmagasabb víztartalmúnak, míg a vegyes ültetésű, és a tisztán vad típusú növényeket tartalmazó tenyészedényekben a víztartalom egyforma ütemben csökkent le (ld. 30. ábra).



30. ábra: Gravimetrikus víztartalom változása *Arabidopsis* vad típusú (A(wt)) és *cbp20* mutáns (B (mut)) növények esetében külön tenyészedényben, és közös tenyészedényben (C – Col-0 és *cbp20*) nevelve azokat (a ** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,1$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

5.3.2. *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia és *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *era-1* mutáns vizsgálatai a növények kompetíciós helyzetében vízmegvonás mellett

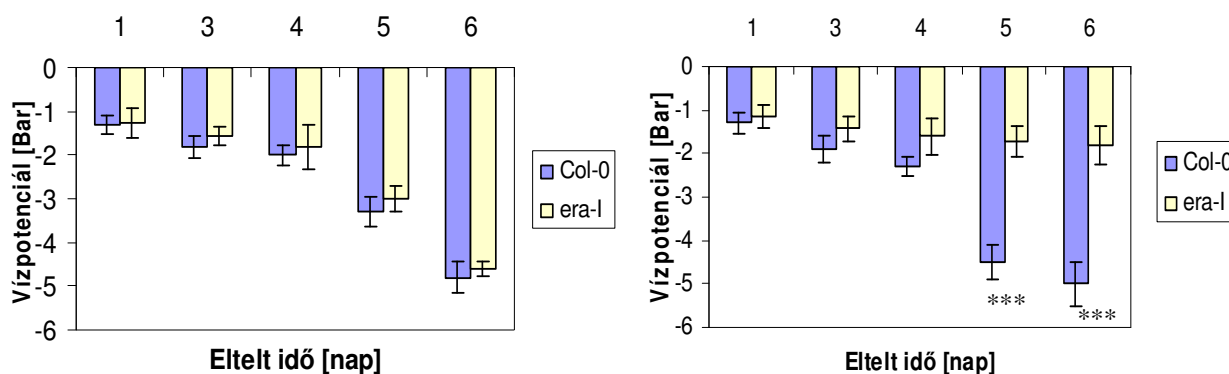
Megvizsgáltuk az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *era-1* mutánst az előzőekben leírtakhoz hasonló kísérleti körülmények között, hogy bebizonyítsuk, a *cbp20* mutánsnál tapasztalt eredményeink nem csak ennek a mutánsnak egy kivételes tulajdonságát mutatják.

Kilenc darab *era-1* mutánst ültettünk egy tenyészedénybe, egy másikba 9 darab Col-0 vad típust, míg egy harmadikba 5 vad típusú, és 4 mutáns növény került (az elrendezést ld. 26. ábra). A növények teljes fejlettségénél vízhiánynak tettük ki őket (ld. 31. ábra) és nyomon követtük azok vízpotenciál értékeit.



31. ábra: Col-0 vad típusú (A), *era-1* mutáns (B), és Col-0 vad típusú és *era-1* vegyesen ültetett (C) *Arabidopsis* növények egy hét szárazság elteltével (a mutánsokat a "C" tálcában sárga csillag jelöli)

A kísérlet során a vízpotenciál értékek a csak *era-1* mutánst tartalmazó tálcában lévő növényeknél maradtak magasabbak, míg a vegyes, és a csak vad típust tartalmazó tálcák növényeinek vízpotenciál értékei lecsökkentek (ld 32. ábra). A szemmel jól látható változásokat, amiket a Col-0 vad típusnál megfigyeltünk, az *era-1* mutáns nem mutatta a vízhiányos stressz hatására, levelei zöldek, turgescensek maradtak.

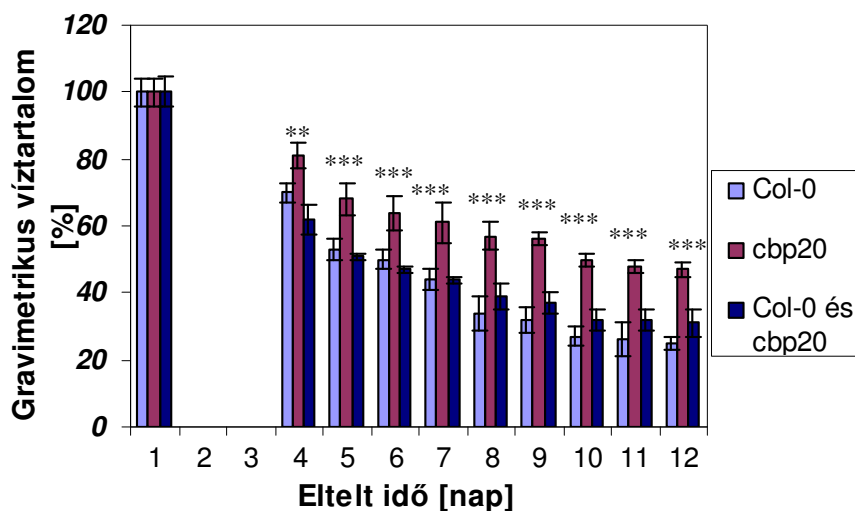


32. ábra: Vízpotenciál alakulása vad típusú (Col-0) és *era-1* mutáns *Arabidopsis* növényekben közös tenyészedényben (bal oldalon), ültetve külön tenyészedénybe ültetve (jobb oldalon) 7 napos vízmegvonás során. (A *** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,01$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki.)

5.3.3. A növények vizsgálata csökkentett vízutánpótlás mellett

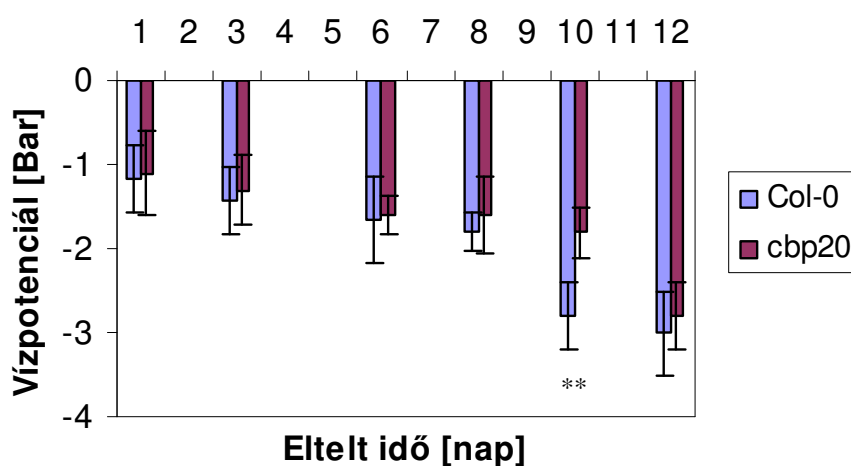
Természetes körülmények között az aszályos periódusok nem mindig jelentenek teljes vízhiányt, a nem kielégítő vízellátás is vízhiányos stresszt jelent a növény számára. Meg szeretnénk vizsgálni, vajon az ilyen, természeteshez közelebbi körülmények között is jelentkezik-e a kompetícióból adódó már megfigyelt hatás. Ennek modellezésére *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia és *cbp 20* mutáns növényeket az ismertetett összetételű földkeverékben felneveltünk, majd csökkentett vízutánpótlás mellett vizsgáltuk kölcsönhatásukat. A vad típusú, illetve a mutáns növényeket külön-külön, illetve közös tenyészedényben felnevelve (ld. 26. ábra) 2 hét kezelés során a vad típusú növények kiszáradtak, míg a mutánsok állapota nem változott jelentősen. A gyors kiszárással azonos módon, a vad típusú növények közé ültetett mutánsok itt sem mutattak fokozott szárazságtűrést.

A gravimetrikus víztartalom értékek alapján a csak *cbp20* mutánst tartalmazó edények földkeverékének víztartalma a 12. napon még 50% körül volt, míg a csak vad típusú növények, és a vegyesen beültetett edények földkeverékének víztartalma 20-30% közé süllyedt (33. ábra).

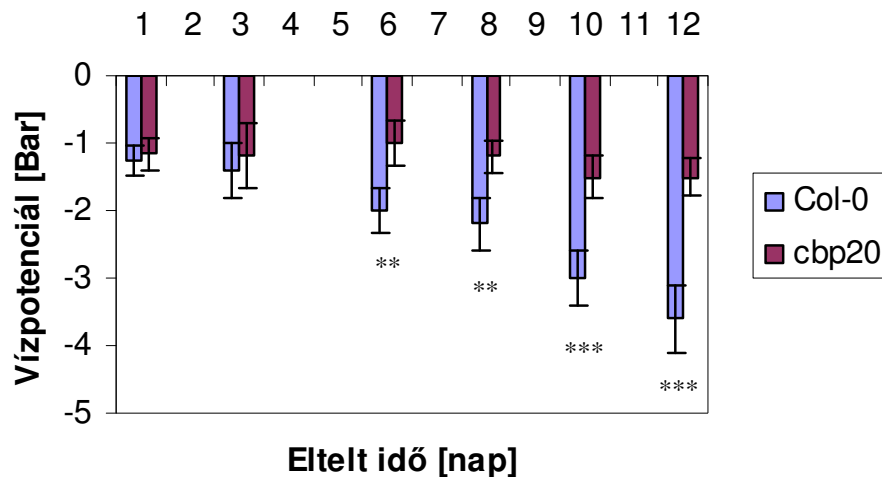


33. ábra: Gravimetrikus víztartalom nyomonkövetése *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia vad típusú, illetve *cbp20* mutáns növényekben csökkentett vízutánpótlás mellett, a növényeket külön, illetve vegyesen ültetve (ld. a szövegben) (a ** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,1$ szignifikanciaszint mellett, a ***- al jelölteknél $p < 0,01$ szignifikancia mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

A vízpotenciál értékeket nyomon követve is hasonló eredményeket kaptunk, mint a teljes vízmegvonás során. A csak *cbp20* mutáns növényeket tartalmazó tálcákban lévő növények vízpotenciál értéke jelentősen nem változott, míg a vegyes ültetésű tálcákban lévő növényeké - a mutáns növényeket is beleértve - lecsökkent (34. és 35. ábra).



34. ábra: Vízpotenciálok alakulása vad típusú (Col-0) és *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növényekben közös tenyészедényben 12 napos vízmegvonás során (a ** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,1$ szignifikanciaszint mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)



35. ábra: Vízpotenciál értékének alakulása vad típusú (Col-0) és *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növényekben külön tenyészedenyben (a ** -gal jelölt adatsorok között $p < 0,1$ szignifikanciaszint mellett, a ***- al jelöltekéknél $p < 0,01$ szignifikancia mellett F próba és T próba alkalmazásával eltérés mutatható ki)

5.4 A CBP20 GÉN SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AZ ALTERNATÍV SPLICING („ÖSSZEVÁGÓDÁS”) MECHANIZMUSÁBAN

Mivel a *CBP20* gén az mRNS 5' cap kötését befolyásolja, de csak néhány gén mRNS mennyiségében mutatható ki különbség microarray technikával a mutáns és a vad típusú növények között, feltételeztük, hogy a *CBP20* gén más gének megnyilvánulását alternatív splicingon keresztül szabályozhatja. Ennek igazolására megpróbáltunk vad típusú és *cbp20* mutáns *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia növényekből olyan géneket kiválasztani, melyeknél ismert hogy mRNS-ük alternatív splicinggal érik (Zhou et al., 2003).

A stresszválasz jelátviteli rendszereinek génjei közül választottunk ki néhány jelöltet, amelyeknél az alternatívan kivágódó intron genomi szekvenciájának két oldalára primereket terveztünk. Sajnos csak néhány gén vizsgálatára volt lehetőségünk, melyekről készült PCR termékek között nem találtunk a vad típusú és a mutáns növények alternatív splicingjára utaló jelet a géleken. A vad típusú és *cbp20* *Arabidopsis thaliana* növényekből készített cDNS mintákon elvégzett egy tipikus RT-PCR reakció eredménye a 36. ábrán látható.



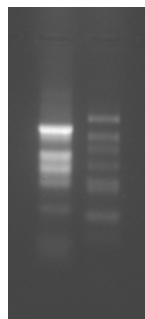
Unknown:Unknown identity= 78%

```

• 1 MASLFKEQAKLSAYRDRRFSGTQEEFDEALRASTTVYIGNVSFYTTEEQLYELFSRAGEI
• | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
• 16 MASLFKDLAKISAYRDKRFPGTQEEFEDALLRSITVYVGNMSFYTTEEQVYELFSRAGEI
•
• 61 KKIIMGLDKNTKTPCGFCFVLFYSREDTEDAVKYISGTILDDRPIRVDFDWGFQEGRQWG
• Hiba! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
• 76 KKIVMGLDKNSKTPCGFCFIMYYSRDDAEDSVKYISGTILDDRPIRVDFDWGFQEGRQWG
•
• 121 RGRSGGQVRDEYRTDYPARGGYGKLVQKELEAQRQLVDYGTGSLGAYPQAAPTNYGNR
• | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
• 136 RGRSGGQVRDEYRTDYPGRGGYGKLVQKELEAQRQLVDYGTGSLGAYPPVMPPPHY.GR
•
• 181 RGGGNYGQGGQNRHGRGDYHRKRQRDDDRYGRDNSRRNTDHES A.thaliana.CBP20
• | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
• 195 HNGGNHGRGGSYRHGR.DYHRKRHREDDHHRPDYPKRTYERES L.esculentum
CBP20

```

A paradicsom TC117999 jelű fehérjét kódoló gén egy szakaszát és egy spacer régiót a paradicsom össz RNS-ből (38. ábra) átírt cDNS-ről PCR reakció segítségével a LeCBP1 - LeCBP2 primerekkel (szekvencia adatokat lásd a mellékletben M/2) emeltük ki.



38. ábra: 5 µl paradicsom össz RNS 3 hetes zöld növényből kivonva (balra) és molekulásúly marker 4 µl Fermentas High Range RNS MM (jobbra)

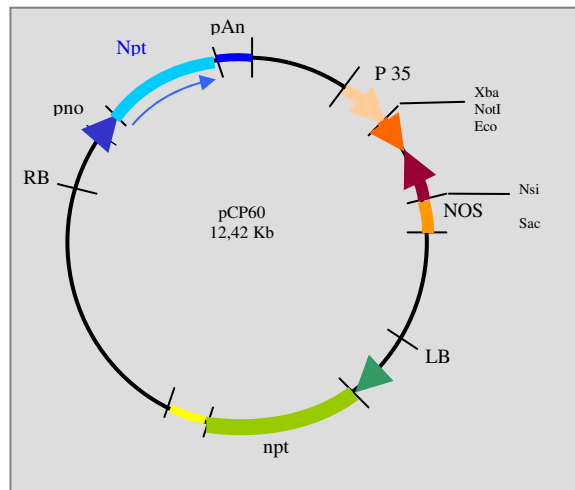
Később publikált adatokból kiderült, hogy ez a szekvencia tulajdonképpen 2 EST-ből származik (TC 171884 és TC187934). A TC 171884 több szövetben is megtalálható a növényben, míg a nagyobb méretű TC187934-nek valószínűleg az ovárium, illetve a termés fejlődésében van funkciója. Szerencsére az általunk klónozott génszakasz mindkét génnel átfedést mutatott, így alkalmas volt a megfelelő géncsendesítő konstrukció létrehozására. A PCR termékeket GFX oszloppal tisztítottuk, és pKSII vektorba (ampicillin rezisztens) építettük be (ld. M/9). *Escherichia coli* TOP10 törzséből a transzformációhoz kompetens sejtet készítettünk, majd ebbe transzformáltuk a pBluescript vektort a beépített génszakasszal együtt, hősokk módszert alkalmazva.

Az LB táptalajon (összetételét ld. M/3) kinőtt telepek közül a rekombinánsokat kék/fehér szín szelekcióval választottuk ki. Néhány rekombináns telepnél a beépített génszakasz meglétét ellenőriztük, közülük kiválasztottunk egyet, ahol a beépített génszakasz szekvenciáját meghatároztattuk, és ezt -70 °C-on glicerines oldatban tároltuk.

A fordított orientációjú beillesztéshez LeCBP3 és LeCBP4 primerekkel (szekvencia adatokat lásd M/2) emeltük ki a paradicsom össz cDNS-ből RT-PCR segítségével a TC117999 EST egy másik szakaszát. Ezt az átfedő génszakaszt az előzőekhez hasonlóan klónoztuk (ld. M/6-7), szekvenciáját ellenőriztük, majd összekapcsoltuk a két szegmenst fordított orientációban. Ily módon elkészítettünk egy olyan génkonstrukciót, mely a paradicsomban csendesítendő gén egy részét, egy spacer régiót, és az adott génfragmentet fordított orientációban is tartalmazta. Ez az

„inverted repeat“ DNS szekvencia mRNS-sé átírva önmagával hajtú-struktúrát képes kialakítani (ds RNS), ezáltal pedig hatékonyan beindíthatja a sejt természetes géncsendesítő mechanizmusát.

A kész konstrukciót a növénytranszformációra alkalmas pCP60 bináris plazmidba építettük át (ld. M/9 és 39. ábra), majd *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 törzsbe transzformáltuk (ld. M/6-7).



39. ábra: Fordított tükörképi szekvenciát tartalmazó pCP60 plazmid

5.6. *ARABIDOPSIS CBP20* GÉN HOMOLÓGJÁNAK AZONOSÍTÁSA RIZSBEN, ÉS GÉNCSENDESÍTŐ KONSTRUKCIÓ KÉSZÍTÉSE

Bioinformatikai módszerrel, a BLAST algoritmust használva a rizs genomában egy az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *CBP20* génnel erősen homológ szekvenciát sikerült azonosítani (Os02g39890). A genomi DNS-ből PCR amplifikáció segítségével e gén megfelelő szakaszait felszaporítottuk CR1 és CR2 primerek segítségével (szekvenciaadatokat lásd M/2). CR5 és CR6 indítoszekvenciákkal egy ezzel átfedő gendarabot intronnal együtt is kiemeltünk, így a paradicsomhoz alapjában hasonló, de egy intront is tartalmazó fordított tükörképi szekvencia kialakítása vált lehetségessé (40. ábra).

5'

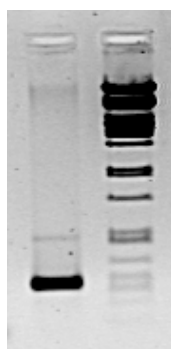
GAATTCCCTCTTCAAGGTACGGATTCCCCCCCCCCCCCTCCGAAACCCTAGCTACCCGAG
CTCGTCGATTCCCCCTCCTCTCGCCCTTCCTCTGAGGCGGCTCGCCCGATTGCTTTTCCAGGAC
CCGACCAAGCTGTCCGCGTACCGGGACAGGCGGTTACCGGGACGCAGGAGGAGTACGAGGCGGC
GCTGCAGGCGTCGGTgACGGTGTACGTCGGGAACATGTCCTTCTACACCACGGAGGAGCAGGCCT
ATGAGCTCTTCTCCCGCGCCGGCGAGATCAGGAAGATCATCATGGGACTCGACAAGAACTCCAAG
ACCCCTGCGGCTTCTGCTTCATACTGGTCGAC 3'

1.intron

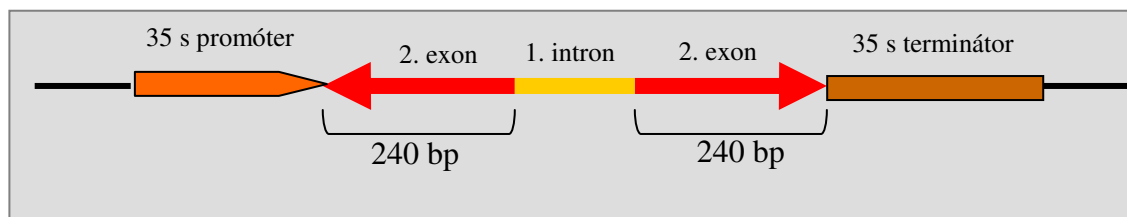
2.exon

40. ábra: A rizs inverted repeat konstrukciót alkotó 1. intron és 2. exon szekencia

A PCR-el amplifikált cDNS darabokat (41. ábra) pKS vektorba építettük, szekvenciáikat ellenőriztük, majd azokból fordított ismétlődésű konstrukciót készítettünk (ld. M/6-7).



41. Ábra: Rizs cDNS-en CR1 és CR2 primerekkel készült RT-PCR termék ellenőrzése vektorba klónozás előtt (bal oldali oszlopban) és molekulásúly marker (jobb oldali oszlopban)



42. ábra: A rizs Os02g39890 gén szekvenciájából készült fordított tükörképi konstrukció sematikus ábrája

A konstrukciót ezután átemeltük pIP454 plazmidba, mely hygromycin rezisztenciája miatt szelektálható paradicsomban. A pIP454 a pCAMBIA1300 vektortól csak abban tér el, hogy CaMV35S promóter és terminátor kazettákat tartalmaz. Az elkészített pIP454 alapú rekombináns plazmidot *Escherichia coli* baktériumban sokszorozítottuk fel, és transzformáltuk át *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe, majd szerkezetét ismét ellenőriztük. Dr. Györgyey János kutatócsoportja sikeresen végzett ezzel a konstrukcióval rizs transzformálást, a transzgén jelenlétét kimutatták a növényekben, melyek biológiai tesztelése jelenleg is folyik.

5.7. A PARADICSOM TRANSZFORMÁLÁS EREDMÉNYEI

5.7.1. Levél transzformáció

A paradicsom növény levél transzformációját az első lombszelekcióval végeztük. A baktériumos fertőzést követően a levéldarabokat MS táptalajon neveltük. A kalluszosodás mértéke 35%-os volt, mely új részek már ellenállóak voltak a használt antibiotikumokkal szemben. Az ezekből a részekből nevelt növényeknek csak nagyon kis része hozott gyökeret, és mindössze egy egyed sikerült üvegházi körülmények között felnevelni.

5.7.2. Sziklevél transzformáció

A paradicsom sziklevél transzformáció során a levéltranszformációval szemben sokkal több levéldarabon jelent meg kallusz, és az ebből történő növényregeneráció is hatékonyabbnak bizonyult. A fertőzött részek 70%-a hozott antibiotikumra rezisztens kalluszt, és ezekből szintén nagy százalékban sikerült növényt nevelni, illetve gyökereztetni (2. táblázat).

Összesen 28 antibiotikum-rezisztenciát mutató növényt szelektáltunk és ülettünk ki üvegházba (43. ábra). Ezen növények molekuláris vizsgálatait végeztük el a transzformáció bizonyítására.

2. táblázat: A túlélő növények aránya a növényregeneráció különböző lépései során

	levéltranszformáció	sziklevél transzformáció
Fertőzött növényi részek száma	120 levél	250 sziklevél
Rezisztens hajtások megjelenése a növényi részen	35%	70%
A gyökeret növesztő rezisztensek aránya	2%	13%
Kiültetett rezisztensek aránya (fertőzöttek=100%)	1%	11%

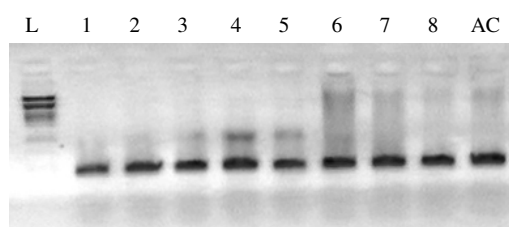


43. ábra: Paradicsom regeneráció transzformált sziklevélből

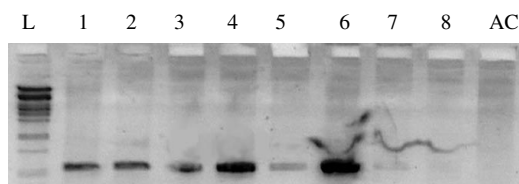
5.8. A PARADICSOM TRANSZFORMÁCIÓ IGAZOLÁSA PCR REAKCIÓVAL

A növényi DNS minták ellenőrzésére paradicsom ubiquitin génre specifikus indítószekvenciákat terveztünk, és ezekkel végeztünk kontroll PCR reakciót a mellékletben közölt kapcsolási hőmérsékletek használatával (44. ábra) (ld. M/2).

A transzformáció igazolására az NPT II markergénre tervezett PCR reakciót alkalmaztunk. Ez a vizsgálat elég érzékeny volt ahhoz, hogy a transzgént nagy biztonsággal kimutassa a növényi mintákból (45. ábra).



44. ábra: A paradicsom növényi DNS minták ellenőrző PCR reakciói ubiquitin génre specifikus indítószekvenciák alkalmazásával. „1-8“-ig vélt transzformánsok, „AC“ vad típusú (Ailsa Craig) paradicsom növény „L“ molekulasúly marker



45. ábra: Transzformált paradicsom növények DNS-én futtatott PCR reakciók termékei NPT II rezisztenciagénre specifikus indítószekvenciákkal. „1-8“ ig feltételezett transzformánsok, „AC“ kontroll (Ailsa Craig paradicsom), „L“ molekulasúly marker

A kontroll ubiquitin génre készített indítószekvencia a PCR során minden növényi mintából képes volt felszaporítani a célszekvenciát, így bizonyítottuk a DNS kivonás és a PCR reakció alkalmasságát a transzgén kimutatására.

Az antibiotikum-ellenállóságot biztosító génre specifikus indítószekvenciák azokban az esetekben adtak pozitív jelet, amikor a növényi DNS tartalmazta a bejuttatott T-DNS-t, és így nagy valószínűséggel a géncsendesítő konstrukciót. A kísérlet eredményei alapján a 45. ábrán 1-7-ig jelölt minták bizonyultak transzformánsnak.

A kimutatást több alkalommal megismételve azonos eredményeket kaptunk. Összesen 20 esetben kaptunk pozitív jelet a minták elemzése során, így ezeknél a növényeknél bizonyítottuk a transzformáció sikerességét. A transzformálás hatékonysága 8%-os volt.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Bizonyítottuk különböző növényélettani vizsgálati módszerek, ill. műszerek alkalmazhatóságát a vízhiányos stressz nyomon követésében. Kimutattuk, hogy a gravimetrikus víztartalom, a vízpotenciál érték illetve a fotoszintetikus aktivitás mértékének változásai jelzik a legérzékenyebben a vízhiányt, már korai stádiumban is.
- A *cbp20* mutáns részletes vizsgálatával megállapítottuk, hogy ez esetben a gázcsere mértékének csökkenése nem befolyásolja kedvezőtlenül a fotoszintetikus aktivitást. Ugyanakkor vizsgálataink alapján a csökkentett párologtatás nem jelent előnyt a vízért való versengésben a vad genotípussal szemben.
- A CBP20 mutáns alegység szekvencia homológiájának alapján géncsendesítő transzformációs konstrukciókat készítettünk, melyek lehetővé teszik különböző gazdasági növények, így paradicsom, burgonya és rizs szárazságtűrő vonalainak létrehozását.
- Kidolgoztunk egy szikleveél alapú paradicsom transzformációs rendszert, és több független transzformáns vonalban igazoltuk a transzgén beépülését.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

7.1. *ARABIDOPSIS* NÖVÉNYEKEN VÉGZETT MŰSZERES FITNESS VIZSGÁLATOK

Vizsgálataink során kifejlett *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia vad típusú és *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* növényeket vetettünk alá szárazság stressznek, hogy megvizsgáljuk, más módon viselkedik-e a mutáns növény fotoszintetikus rendszere a vad típushoz viszonyítva. Ezen vizsgálatok során több élettani és fitness tulajdonságot jellemző értéket követtünk nyomon mérőműszerek segítségével. Jól öntözött állapotban a mutáns és a vad típusú növény hasonló élettani paraméterekkel bír, bár a nem-fotokémiai kioltás a mutánsban valamivel magasabb értéket mutatott. A gravimetrikus víztartalom meghatározásból nyilvánvaló, hogy a mutáns jól öntözött állapotban is kevesebb vizet párologtat a vad típusnál, gázcseréje tehát már akkor korlátozott. A mutáns fotoszintetikus aktivitásának értéke ilyen körülmények között gyakorlatilag megegyezik a vad típuséval, ami arra utal hogy a csökkent gázcsere nem korlátozza a fotoszintézist.

A vízmegvonás következtében kialakuló vízhiányos állapot során a fotoszintetikus aktivitás, a vízpotenciál, a fotokémiai kioltás, a PSII maximális teljesítményének vizsgálata egyöntetűen és szignifikánsan kimutatja a mutáns szárazság toleranciáját, míg a vad típus mért eredményei minden esetben gyengébb teljesítményt mutatnak. A gravimetrikus víztartalom (GWC) változásai a mutáns takarékos vízfelhasználását igazolják.

A GWC, a vízpotenciál és fotoszintetikus aktivitás bizonyultak a leginkább érzékeny mutatóknak a szárazságstressz követésére, míg a klorofill fluoreszcencia kinetika Φ_{PSII} , fotokémiai és nem fotokémiai kioltás valamint Fv/Fm értékei változtak a legkésőbb a mért értékek közül.

Yang és kutatócsoportja a mi eredményeinkhez hasonlóan megállapította, hogy az Fv/Fm érték közepesen stresszelt növényeknél nem alkalmas a szárazságstressz kimutatására, mivel nem mutat eltérést a stresszelt és a normál állapotú növények között (2009).

A termolumineszcencia mérésben a szárazságnak kitett növényekben 9 nap vízmegvonás mellett (22/20 °C) a vad típusú növényekben (Columbia) a távoli vörös fénnel indukált TL görbén már csak a HTL sáv volt detektálható, míg a mutáns növényekben jól mérhető B és AG sáv egyaránt megvolt. Mindemellett a kontroll vad típusú genotípusban kimutatható volt egy 70

°C körüli csúcshőmérséklettel jellemezhető sáv, mely a mutánsban alig detektálható, és erős szárazság stressz után is eltűnt. Ennek a sávnak a jelentősége az irodalomban vitatott, érdekes azonban hogy a mutáns növények ezt csak nyomokban tartalmazzák (Bacsó et al. 2008/a).

7.2. A HASZNÁLT MŰSZEREK ÉS MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Vizsgálataink során a szárazságstressz kimutatására több műszert és módszert használtunk. Ezek közül kialakítása miatt az FMS 2 stabilabbnak mutatkozott a környezeti változásokkal szemben. Azonos mérésszám mellett az LCI-vel végzett mérések nagyobb szórást mutattak.

A szárazságstressz érzékelésére a földszálmérésen alapuló gravimetrikus módszer bizonyult a legalkalmasabbnak, ez azonban szántóföldi körülmények között nem alkalmazható. A műszeres mérések közül a vízpotenciál és a fotoszintetikus aktivitás mérése közepes szárazságstressz esetén adott információt, a Φ_{PSII} paraméter ennél kevésbé volt érzékeny. A legkevésbé érzékenynek a szárazságstresszre az F_v/F_m érték, a fotokémiai és nem fotokémiai kioltások mutatkoztak. Eredményeink alapján szabadföldi kísérleteknél a vízpotenciál mérés (pl. Scholander bomba elven) illetve a fotoszintetikus aktivitás meghatározása (pl. IRGA típusú készülékkel) javasolható.

Ezek az eredmények összevethetők ismert irodalmi adatokkal; a fotoszintetikus aktivitás mérését találta a leginkább informatívnak a szárazságtűrés detektálására Privé és Janes (2003) málna vizsgálata során.

7.3. MAGHOZAM ÉS CSÍRÁZÓKÉPESSÉG VIZSGÁLATA

A vad típusú, illetve a mutáns növények maghozamát, illetve csírázóképeségét is megvizsgáltuk, ahol különbségeket tapasztaltunk a mutáns kárára. Az általunk alkalmazott növénynevelési és csíráztatási körülmények között a *cbp20* mutáns maghozama és a magvak csírázóképesége is alulmúlta a vad típusú növény paramétereit. A növények friss zöld tömege, illetve ezermag tömege között nem találtunk szignifikáns különbséget.

A jelenség valószínűleg a mutáns ABA érzékenységének köszönhető. Az ABA csírázásgátló hatása *Arabidopsis*-ban ismert, az *abh1* nCBC mutánst éppen ennek a tulajdonságnak köszönhetően sikerült izolálni. Az ABA hatása egyéb, pl. haszonnövények csírázására nem feltétlenül egyezik meg ezzel. Saját kísérleteink szerint a paradicsom csírázását pl. az ABA nagy koncentrációban sem gátolta (saját, nem közölt eredmények). Eredményeink szerint tehát kijelenthetjük, hogy a *cbp20* mutációnak *Arabidopsis*-ban csírázást csökkentő hatása van. A fentiek alapján azonban ebből nem következtethetünk egyértelműen arra, hogy a jelenség a létrehozandó *CBP20* gátolt haszonnövények esetében is megjelenik majd.

7.4. *ARABIDOPSIS THALIANA* CV. COLUMBIA *cbp20* ÉS *ARABIDOPSIS THALIANA* CV. COLUMBIA *era 1* MUTÁNSOK VIZSGÁLATA VÍZÉRT VERSENGŐ HELYZETBEN

Az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* mutáns növény élettani vizsgálatainak során felmerül az a kérdés, hogy vajon a mutáns növény csökkent párologtatása okoz-e előnyt a növény számára, ha agresszív vízgazdálkodású növény közelébe ültetve vizsgáljuk. Ennek megválaszolására kompetíciós kísérleteket állítottunk be, melyek során a mutánsokhoz képest pazarlóan párologtató vad típusú *Arabidopsis* növényeket használtunk, mint kompetítorokat. Szabadföldi körülmények között ilyen pozícióban más fajok, pl. gyomnövények vetélkedése lehet számottevő. A felnőtt *Arabidopsis* növényeket (nyolc, illetve kilenc hetes korban az eltérő gyorsaságú növekedés ellensúlyozására) egy tenyészedénybe ültetve (öt vad típusú növényt négy mutáns növényrel vegyesen ültetve) nyomon követtük a növények olyan élettani tulajdonságait, melyekkel jól jellemezhetővé váltak a bekövetkező változások. A növények gyökerének tömegét mérve nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a vad típusú, illetve a *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növények között. A vízpotenciál értékek a hat napos teljes vízmegvonás, illetve a tizenkét napos csökkentett vízutánpótlás során is jelentős különbséget mutattak a vegyesen ültetett, és a csak mutáns növényeket tartalmazó tenyészedényekben mért értékek között. A kompetíció hatására a mutáns növények nem voltak képesek érvényre juttatni csökkent párologtatásukból származó előnyüket, mivel feltehetően a vad típusú növények felérték a gyökérzet közelében lévő víztartalékokat, és a növények azonos ütemben száradtak ki.

Eredményeinkhez hasonló megállapításra jutott az a japán kutatócsoport is, akik köles (*Pennisetum glaucum* cv. Okashana-1) és tehénborsó (*Vigna unguiculata* cv. Nakale)

kompetícióját vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a vegyesen ültetett növények esetében a köles transzpirációja 40%-al esett vissza a monokultúrában nevelt köles kontroll növényekhez képest. A mért alacsonyabb vízpotenciál értékek is a versengés során kialakuló hátrányos hatásra utaltak (Zegada-Lizarazu et al., 2006).

Hogy eredményünket általánosíthassunk, azonos kísérleti beállítások mellett *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *era-1* mutáns növényeket is vizsgáltunk. Az *era-1* mutáns a *cbp20*-hoz hasonlóan ABA túlérzékeny, csökkent párologtatással rendelkezik. A farneziltranszferáz gén β -alegységében sérült, mely az abszcizinsav jelátviteli út egyik ágát szabályozza (Wang et al., 2005). A növény már kis mennyiségű ABA-ra is érzékenyen reagál, ami mellett fokozott szárazságtűréssel rendelkezik. Vad típusú *Arabidopsis*-al közös tenyészedénybe ültetve 6 nap vízmegvonás után az *era-1* mutáns is kiszáradt, ami azt látszik igazolni, hogy a csökkentett párologtatású ABA túlérzékeny mutánsok kompetíciós helyzetben esetleg nem képesek a vízért hatékonyan versengeni. Ez befolyásolhatja a mutáció típus biotechnológiai hasznosíthatóságát.

Az eredmények a szárazságtűrő mutánsok genetikai screen-elésére (kiválogatására) alkalmazott módszerek megválasztására is vonatkoznak. A jelenség alapján a párologtatási mutánsok kiválasztásához nem elegendő a magvak egy edénybe (egy táblába) sűrűn egymás mellé vetése és a vízmegvonás. Alternatívaként alkalmazható módszer lehet a hőfényképezés, mely a megváltozott transzpiráció miatti hőmérsékletváltozás mérésével képes kiszűrni a kevesebbet párologtató növényeket a többi közül (Wang et al., 2004).

7.5. A MOLEKULÁRIS MECHANIZMUS (ALTERNATÍV SPLICING) VIZSGÁLATA

Az *CBP20* gén szerepét emlős és élesztő rendszerekben régóta vizsgálják. Mivel a magi cap kötő komplex egyik alegysége, feltételezték, hogy szerepe lehet az RNS magból való exportjában, illetve érésében (Federoff, 2002). A génátíródás utáni un. poszttranszkripciós szabályozás része az RNS érése és degradációja is. Az RNS kötő fehérjék és az RNS helikázok alapvetően meghatározzák az RNS sorsát. Egy ilyen poszttranszkripciós szabályozási lehetőség az un. alternatív splicing, melynek során az intronok kivágódásában alternatív variációk jelennek meg egyazon gén esetében, különböző funkciókat hordozva (Mazzucotelli et al., 2008). Újabb

eredmények szerint a növényi gének jelentős része (20-60%-a) alternatív splicinggal érik (Ner-Gaon et al., 2007).

Kimutatták, hogy az miRNS-ek mennyisége a *cbp20* és a *cbp80/abhl* *Arabidopsis* mutánsokban lecsökkent a vad típusban mérthez képest, míg a pri-mi RNS-ek mennyisége megnőtt (Kim et al., 2008). Erre a legegyszerűbb magyarázat Kim szerint az lehet, hogy az nCBC a pri-mi RNS-ek splicing-ját segíti, és így jönnek létre az érett miRNS-ek. Az miRNS-ek a már ismertetett módokon további gének szabályozását végzik. Itt tehát az miRNS-eket kódoló gének alternatív splicingját szabályozza az nCBC. Ugyanezen kutatók az nCBC mutánsokon a legmodernebb, ún. TILLING array hibridizációval egyszerre a genom összes génjének minden egyes exonján kifejeződési vizsgálatokat végeztek. Eredményeik szerint direkt módon bizonyos célgének alternatív splicingja is megváltozott az nCBC mutánsokban, a teljes genomban néhány száz ilyen gént találtak.

Vizsgálataink idején ezek az eredmények még nem voltak hozzáférhetők. A kísérleteinkben olyan génekkel dolgoztunk melyeknél ismert, hogy mRNS-ük alternatív splicinggal érik (Zhou Y et al., 2003). A stressz- vagy jelátviteli rendszerek génjei közül választottunk ki néhány ilyen jelöltet, melyek azonban nem mutattak különbségeket az RT-PCR gélképeken. Mivel csak néhány gén vizsgálatára volt lehetőségünk nem sikerült találnunk alternatívan összevágódó géneket, szemben a teljes genomot lefedő újabb kutatásokkal.

7.6. GÉNCSENDESÍTŐ KONSTRUKCIÓ KÉSZÍTÉSE PARADICSOMBAN, BURGONYÁBAN ÉS RIZSBEN

Annak vizsgálatára, hogy az *Arabidopsis*-ban jelen lévő *cbp20* mutáció okoz-e szárazságtűrő fenotípust haszonnövényekben is, paradicsomban, rizsben és burgonyában ehhez a génhez ortológ szekvenciákat kerestünk. Paradicsomban 78%-os homológiát mutatott két EST szekvencia is, a TC171884 és a TC187934, melyek egymáshoz nagyon hasonlóak. Burgonyában a legnagyobb homológiát mutató EST szekvenciája megegyezett az egyik paradicsom szekvenciával, ez a burgonya Stu3353 jelű génje. Rizsben az Os 02g39890 jelű génre terveztünk csendesítő konstrukciót.

A géncsendesítő konstrukciók tervezése során figyelembe vettük, hogy a fordított ismétlődést tartalmazó szekvenciák csendesítő hatásfoka jóval meghaladja az egyéb konstrukciókét (Waterhouse et al., 1998; Wang et Waterhouse, 2000). Munkánk során előállítottunk egy paradicsom növénybe tervezett, és egy rizsre tervezett fordított tükörképi géncsendesítő konstrukciót, melyeket növénytranszformáláshoz használtunk fel.

7.7. NÖVÉNYTRANSZFORMÁCIÓ

A létrehozott géncsendesítő konstrukcióval laboratóriumunkban paradicsom transzformációs munkát kezdtünk. E mellett az általunk készített konstrukciókat együttműködés keretében a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban burgonya, illetve a Szegedi Biológiai Központban rizs növényekbe transzformálták.

Munkánk kezdetekor a paradicsom transzformációs módszerek közül választanunk kellett. A paradicsom sziklevel transzformációja illetve a dekapitálás utáni fertőzése *Agrobacteriummal* elterjedt módszerek. Mi munkánk során a lomblevel és a sziklevel transzformáció hatékonyságát vizsgáltuk, és a lomblevel transzformációt nem találtuk elég megbízhatónak a növénytranszformáláshoz. A sziklevel transzformáció során 8%-os transzformációs gyakoriságot értünk el több módszer optimalizálásával, a transzformált vonalakban a marker transzgéneket PCR reakcióval mutattuk ki.

Előzetes eredményeink szerint nem tapasztaltunk jelentős fenotípusos változást a vad típusú, illetve a transzgenikus paradicsom növények között, azok szárazságtűrésének tesztelése még folyamatban van. Ugyanakkor velünk párhuzamosan Gödöllőn Bánfalvi Zsófia és csoportja is sikeresen burgonyába juttatta ezt a konstrukciót. A kísérletek szerint ez csendesítette a burgonya *Stu.3353* gént, a transzgenikus növények levelének víztartalma magasabb maradt szárazságstressz alatt (Bánfalvi, személyes közlés).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cap binding protein 20* (*cbp20*) egy olyan funkcióvesztéses mutáns, mely abszcizinsavra fokozottan érzékeny, csökkent párologtatású és szárazságtűrő fenotípussal rendelkezik. A magi *cap* kötő komplex, az nCBC egyik alegységében T-DNS inszercióval keletkezett mutáns a víz fokozott visszatartására képes a vízhiányos időszakokban.

Kutatásaink eredményeképpen bebizonyosodott, hogy a csökkentett párologtatás ellenére a *cbp20* mutáció nem befolyásolja hátrányosan a növény fotoszintézisét, ami a gátolt gázcseré egy lehetséges következménye lehetne. Ez a kedvező eredmény a mutáns növények termesztetőségét valószínűsíti. A mutáció jó vízellátásnál a vizsgált modellnövény fajban kedvezőtlenül befolyásolta a csírázási arányt és magszámot. Ezeket a jellemzőket haszonnövények módosítása esetében kiemelten vizsgálni kell. A normál vízellátottság mellett meghatározott további hozamparaméterek közül az ezermag tömeg és friss zöld tömeg azonosnak bizonyult a mutáns és a vad típusú növényeknél. Vízhiány esetén a mutáns előnye a vad típusú növényhez szemben nyilvánvaló, kísérleteinkben tartós vízmegvonáskor a vad típus pusztulását is túléli.

Mivel a növényi vízgazdálkodás jellemzésére a szakirodalomban több élettani folyamat különböző paramétereit használják, összevetettük ezeknek a paramétereknek az érzékenységet a szárazságstressz kimutatására *Arabidopsis* növényben. Megállapításaink szerint a szárazságstressz kimutatására a műszerekkel mérhető paraméterek különböző mértékben alkalmasak. A földszálméréssel alapuló gravimetrikus módszer, a vízpotenciál érték és a fotoszintetikus aktivitás mérése a szárazságstressz aránylag érzékeny mutatójának bizonyult. Kevésbé érzékenynek találtuk a fluoreszcencia indukció Φ_{PSII} paramétereit. Az F_v/F_m érték, a fotokémiai és nem fotokémiai kioltások csak erős vízhiány esetén változtak jelentősen.

Annak elemzésére, hogy a csökkent párologtatás okoz-e versenyelőnyt a mutáns növényeknek vízért való versengés esetén, kompetíciós helyzetben is megvizsgáltuk a növények szárazságstresszre adott válaszait. A víz visszatartása versenyhelyzetben nem jelentett előnyt az erőteljesebben párologtató (vad típusú) növényekkel szemben, feltételezhetően azért, mert a csökkent párologtatás során a talajban maradó vizet a vad típusú növények el tudták használni. Így a mutánsok a vad növényekkel azonos ütemben száradtak ki. Hasonló eredményeket kaptunk csökkentett vízutánpótlás adagolásakor, valamint egy eltérő genetikai háttérű ABA túlérzékeny,

csökkentett párologtatású *Arabidopsis* mutáns (*era-1*) esetében is. Eredményeink felhívják a figyelmet a csökkentett párologtatásnak, mint elérendő biotechnológiai illetve nemesítési célnak egy gyengéjére. E szerint az ilyen fajták a vízért való versenyhelyzetben kedvező tulajdonságukat nem mutatják, előnyüket elvesztik. Eredményeinkből következtetést lehet levonni a szárazságtűrő mutánsok szelekciójának hatékony módszereire is.

Munkánk célja volt az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* mutáns részletes élettani vizsgálatán túl annak felderítése, hogy haszonnövényekben működik-e hasonló nCBC szabályozási mechanizmus. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon az *Arabidopsis CBP20* gén ortológjának géncsendesítésével szárazságtűrővé tehető-e egy ilyen gént hordozó haszonnövény. A transzgenikus technológiával folyó kísérletekbe három termesztett növényfajt vontunk be: paradicsom, burgonya és rizs. E fajok genom illetve EST szekvenciái között megkerestük az *Arabidopsis CBP20* gén feltételezett ortológjait. A paradicsom és burgonya szekvenciákat összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy azok 100%-os homológiát mutatnak. Így ebbe a két fajba ugyanazt a génkonstrukciót használhattuk. A szekvenciák alapján géncsendesítő konstrukciót terveztünk és készítettünk.

Mindhárom fajban sikeres génbejuttatás történt, amik közül a paradicsom transzformáció zajlott a laboratóriumunkban. Együttműködés keretében a burgonya transzformációt a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban Dr. Bánfalvi Zsófia, a rizs transzformációt a Szegedi Biológiai Központban Dr. Györgyey János munkacsoportja végezte.

Az elért fenotípus értékelése eddig a géncsendesített burgonya esetében zárult le eredményesen. Ott az együttműködő partnerünk által végzett növénytranszformáció eredményeképpen a levágott burgonyalevelek csökkent vízvesztését figyelték meg a vad kontrollal szemben (Dr. Bánfalvi Zsófia személyes közlés). Ez bizonyítja, hogy az nCBC komplex működése egy termesztett növényfajban is az általunk kívánt módon befolyásolható. A transzformált paradicsom és rizs vonalak tesztelése még folyik, azokból ilyen következtetések még nem vonhatók le.

Az eredmények gyakorlati hasznosítása a jövő biotechnológiai feladatai közé tartozik. Az általunk előállított génmódosított (GM) növényvonalak közvetlen bevonása nemesítési munkába nem célszerű. A GM növényfajták köztermesztése hazánkban, de más országokban is sok problémát vet fel. A *cbp20* mutánsok kedvező fenotípusa azonban egy gén funkciójának megszüntetésén alapul, így létezik olyan biotechnológiai módszer, amivel ezt a célt génmódosítás

nélkül is el lehet érni. Az ún TILLING módszerrel hagyományos módon mutagenizált populációban molekuláris eszközökkel kiválasztható egy megcélzott génre mutáns növényvonal. Ezzel a nem transzgenikus technológiával bármilyen fajban elvben lehetőség van GM mentes *cbp20* vonal előállítására.

Munkánk további célja a létrehozott transzgenikus paradicsom és burgonya vonalak vizsgálata. Ezek a géncsendesített vonalak biotechnológiai jelentőségük mellett segítséget adnak a mutáció hatásmechanizmusának felderítésében is, ami a laboratóriumunk egyik további fő kutatási iránya.

9. SUMMARY

The *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cap binding protein 20* (*cbp20*) is a loss-of function mutant which is increasingly sensitive to abscisic acid, with decreased transpiration and elevated drought tolerance. The mutant contains a T-DNA insertion in one of the subunits of the nuclear cap binding complex.

As a result of our research it became clear that despite the decreased transpiration the *cbp20* mutation doesn't have a negative effect on the photosynthesis of the plant, which could be the possible result of the detained gas exchange. This positive result presumes cultivatable characteristics of the mutant plants. The mutation had a negative effect on the germination rate and seed quantity in the model plant when optimal amount of water was provided. These characteristics need to be analyzed in detail when modifying crop plants. Amongst the other defined yield parameters the kernel weight and the fresh green weight proved to be the same in the mutant and wild plant types in case of normal water supply. When deficient amount of water is provided, the advantage of the mutant plant over the wild type is obvious; it survived substantially longer than the other in case of persistent water deprivation in our experiments.

As scientific literature uses several different parameters of physiological characteristics when describing plant water economy, we compared the sensitivity of these parameters to monitor drought stress in *Arabidopsis*. Our findings show that the parameters that can be measured with the applied instruments are suitable to a different degree. The gravimetric method based on measuring soil weight, the water potential value and photosynthetic activity proved to be relatively sensitive indicators of drought stress. We found the Φ_{PSII} parameter of fluorescent induction to be less sensitive. The F_V/F_M value, the photochemical and non-photochemical extinctions only showed significant changes in case of serious water deprivation.

To analyze whether decreased transpiration gives the mutant plants an advantage in the competition for water we examined the plants' response to drought stress in competitive circumstances. It appeared that sparing water doesn't give advantage against the plants with a more vigorous transpiration (wild type) in a competitive situation; this is presumably due to the fact that in case of decreased transpiration the wild type plants can use up the remaining water from the soil fast and effectively. This caused the mutant plants to desiccate at the same rate as the wild type. We gained similar results when supplying a low amount of water as well as in case of

another ABA supersensitive *Arabidopsis* mutant (*era-1*) with decreased transpiration and a different genetic background. Our results bring the attention to a weakness of transpiration as a biotechnological and breeding goal set to be attained, according to which water saver mutants may not show their favorable characteristics when competing for water. A conclusion can be drawn from our results regarding the effective selection of drought tolerant mutants from a screening population as well.

The aim of our work – apart from the detailed fitness analysis of the *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* mutant – was the examination of the nCBC regulation mechanism in crop plants. We were interested in whether a crop plant can be made more drought resistant with the help of silencing the ortholog of the *Arabidopsis CBP20* gene. Three different plant species were involved in the transgenic experiments: tomato, potato and rice. We searched for the assumed orthologues of the *Arabidopsis CBP20* gene in the EST and genome sequences of these species. By comparing the sequences of potato and tomato we found them to be 100% homologous, therefore we used the same gene construction for silencing in these two plant species. We prepared the necessary gene constructions based on the database sequences.

The gene transformation was successful in all three species out of which the tomato transformation took place in our laboratory. The potato transformation was performed by Dr. Zsófia Bánfalvi in the Agricultural Biotechnology Center in Gödöllő, while the rice transformation was carried out by Dr. János Györgyey's team at the Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Szeged as a part of a cooperation between the institutes.

So far only the evaluation of the gene silenced potato's phenotype has been successfully finished. In this case the plant transformation resulted in a more drought resistant potato (Zsófia Bánfalvi, personal communication). This proves that the functionality of the nCBC complex can be altered in a crop plant. Investigation of the transformed tomato and rice are currently under way, therefore we cannot draw such conclusions in these cases.

The practical utilization of the results is a task of the future. We do not suggest the direct involvement of the genetically modified (GM) plants we produced in the breeding process. The common utilization of GM species raises many questions and problems. On the other hand, the useful phenotype of the *cbp 20* mutants is based on the loss of function of a gene, therefore there is a biotechnological method with which this goal can be reached without genetic modification. A

plant line mutant for a given gene can be selected with molecular methods in a traditionally mutagenized population with the help of the TILLING method. Theoretically there is the opportunity to produce non-genetically modified *cbp20* lines in any species with this non-transgenic technology.

The further aim of our work is the investigation of the transgenic tomato and potato lines obtained. These gene silenced lines – aside from their biotechnological significance – may help us to discover the molecular mechanism underlying the mutant phenotypes, which is one of the main future research interests of our laboratory.

10. MELLÉKLETEK

M/1 Irodalomjegyzék

Acosta M., Pavelka M., Pokorný R., Janous D., Marek M.V. (2008): Seasonal variation in CO₂ efflux of stems and branches of Norway spruce trees. *Annals of Botany*, 101 (3): 469-477.

Aerts R., Boot R.G.A., Van der Aart P.J.M. (1991): The relation between above- and belowground biomass allocation patterns and competitive ability. *Oecologia*, 87: 551-559.

Aerts R., Chapin F.S. (2000): The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of process and patterns. *Advances in Ecological Research*, 30: 1-67.

Ahmed F, E. (2002): Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, (2002 May) 20 (5): 215-23.

Arnold W., Sherwood H. K. (1957): Are chloroplasts semiconductors? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 43: 105-114.

Arrillaga I., Gil-mascarell R., Gisbert C., Sales E., Montesinos C., Serrano R., Moreno V. (1998): Expression of the yeast HAL2 gene in tomato increases the invitro salt tolerance of transgenic progenies. *Plant Science*, 136: 219-226.

Aukerman M. J., Sakai H. (2003): Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and Its *APETALA2*-Like Target Genes. *Plant Cell*, 15 (11): 2730–2741.

Avola G., Cavallaro V., Patanè C., Riggia E. (2008): Gas exchange and photosynthetic water use efficiency in response to light, CO₂ concentration and temperature in *Vicia faba*. *Journal of Plant Physiology*, 165 (8): 796-804.

Bacsó R., Molnár A., Papp I., Janda T. (2008/a): Photosynthetic behaviour of *Arabidopsis* plants with a Cap Binding Protein 20 mutation under water stress conditions. *Photosynthetica*, 46 (2): 268-272.

Bacsó R., Janda T., Galiba G., Papp I. (2008/b): Restricted transpiration may not result in improved drought tolerance in a competitive environment for water. *Plant Science*, 174: 200-204.

Balázs E., Dudits D. (szerk.)(1999): Molekuláris növénybiológia szemelvények. Akadémia Kiadó, Budapest.

Banerjee S., Kommareddy C., Kar K., Bhattacharjee B., Khuller S. (2006): OMNI: An efficient overlay multicast infrastructure for real-time applications. *Computer Networks*, 50 (6): 826-841.

Bartel D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenetics mechanism and function. *Cell*, 116: 281-297.

Berendse F. (1979): Competition between plant populations with different rooting depths. *Oecologia*, 43: 19-26.

Beverly R.B., Tollner E.W., Byous A.W., Thain S.M. (1994): Moisture equivalent as a routine soil physical test to guide irrigation management. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25 (7-8): 1035-1043.

Bhadoria P.B.S., Kaselowsky J., Claassen N., Jungk A. (1991): Impedance factor for chloride diffusion in soil as affected by bulk-density and water-content. *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde*, 154 (1): 69-72.

Bird C. R., Smith C. J. S., Ray J. A., Moureau P., Bevan M. W., Bird A. S., Hughes S., Morris P. C., Grierson D., Schuch W. (1998): The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 11: 651-662.

Brodersen P., Voinnet O. (2006): The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22 (5): 268-280.

Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000): Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland.

Bussay A., Szinell Cs., Szentimrey T. (1999): az aszály magyarországi előfordulásának vizsgálata és mérhetősége. *Éghajlati és agrometeorológiai tanulmányok* 7. OMSZ, Budapest. pp. 6-66.

Caldwell M. M., Manwaring J.H., Durham S.L. (1996): Species interactions at the level of fine roots in the field: influence of soil nutrient heterogeneity and plant size. *Oecologia*, 106: 440-447.

Caruso A, Cheddor F, Carpin S, Depierreux C, Delmotte FM, Kahlem G, Morabito D. (2007): Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165 (9): 932-41.

Chaves M. M. (1991): Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42:1-46.

Chunzi D., Chunxiao J., Laxiang F. (1995): Transgenic tomato and pepper plants containing CMW satRNA cDNA. *Acta Horticulturae*, 402: 78-83.

Cutler S., Ghassemian M., Bonetta D., Cooney S., McCourt P. (1996): A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science*, 273 (5279): 1239-41.

Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D. C. (2000): An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101: 543-553.

Dehio C., Schell J. (1994): Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotical reversible gene transgene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 5538-5542.

Ducruet J. M., Miranda T. (1992): Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence F0 emission in photosynthetic material. *Photosynthesis Research*, 33 (1): 15-27.

Dudits D., Heszky L. (2003): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest, p. 167-201.

Dudits D. (szerk.) (2006): A búza nemesbítésének tudománya, a funkcionális genomikától a vetőmagig. MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair KFT. Szeged, p. 117-119.

Earle E. D., Frary A (1996): An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports*, 16: 235-240.

Ellul P., Garcia-Sogo B., Pineda B., Ríos G., Roig L. A., Moreno V. (2003): The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons

(*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 231-238.

Elmayan T., Vaucheret H. (1996): Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal*, 9: 787-797.

Erdei (szerk.)(2004): Növényélettan, növekedés- és fejlődésélettan. JATE Press, Szeged. pp. 252-255.

Eullaffroy P., Frankart C., Aziz A., Couderchet M., Blaise C. (2009): Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. *Aquatic Botany*, 90 (2): 172-178.

Fári, M. (1993): A paprika és a tojásgyümölcs in vitro morfogenezise és genetikai transzformálásuk újabb lehetőségei. Kandidátusi értekezés.

Fedoroff N.V. (2002): RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (5): 452-459.

Fernandez S., Charles-Delobel C., Geldreich A., Berthier G., Boyer F., Collonnier C., Coué-Philippe G., Diolez A., Duplan M.N., Kebdani N., Romaniuk M., Feinberg M., Bertheau Y. (2005): Quantification of the 35S promoter in DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction and specificity assessment on various genetically modified organisms, part I: operating procedure. *Journal of AOAC International*, 88 (2): 547-557.

Fillatti J. J., Kiser J., Rose R., Comai L. (1987): Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology*, 5: 726-730.

Fire A. (1999): RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics*, 15: 358-363.

Folk, Gy., Glits, M. (1993): Kertészeti növénykórtan. Budapest, Mezőgazda Kiadó, p. 264-265.

Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Eichholtz D. A., Flich J. S., Fink C. L., Hoffmann N. L., Sanders P. R. (1985): The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *Bio/Technology*, 3: 629-635.

Frary A., Earle E. D. (1996): An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports*, 16: 235-240.

Frary A., Hamilton C. M. (2001): Efficiency and stability of high molecular weight DNA transformation: an analysis in tomato. *Transgenic Research*, 10: 121-132.

Gazzani S., Lawrenson T., Woodward C., Headon D., Sablowski R. (2004): A Link Between mRNA Turnover and RNA Interference in *Arabidopsis*. *Science*, 306: 1046-1048.

Gowing D.J.G., Davies W.J., Trejo C.L., Jones H.G. (1993): Xylem-transported chemical signals and the regulation of plant-growth and physiology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*, 341 (1295): 41-47.

Gregory B. D., O'Malley R. C., Lister R., Urich M. A., Tonti-Filippini J., Chen H., Millan A. H., Ecker J. R. (2008): A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis* development. *Development Cell*, 14: 1-13.

Grimsley N., Hohn T., Hohn B., Walden R. (1986): Agroinfection an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83: 3282-3286.

Hajós né (szerk.) (1999): Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Hamlyn G. J. (1998): Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, 49: 387-398.

Hammond S., M-Caudy A. A., Hammon, G. J. (2001): Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics*, 2: 110-119.

Haraszty Á (2004): Növény szerkezettan és növényélettan. Egyetemi jegyzet, Nemzeti Tankönyvkiadó Zrt., Budapest, p. 250-310.

Hideg É., Spetea C., Vass I. (1994): Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 39: 191-199.

Hirka A., Csóka Gy. (2008): 2007: az abiotikus erdőkárak éve. *Erdészeti lapok*, 143 (1): 12-14.

Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas, P. J. J., Schilperoort R. A. (1984): The limited host range of an *Agrobacterium tumefaciens* strain extended by a cytokinin gene from a wide host range T-region. *EMBO Journal*, 3: 3043-3048.

Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Wallroth M., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T. (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.

Hugouvieux V., Kwak J. M., Schroeder J. I. (2001): An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell*, 106: 477-487.

Hugouvieux V., Murata Y., Young J.Y., Kwak J.M., Mackesy D.Z., Schoeder J.I. (2002): Localization, ion channel regulation, and genetic interactions during abscisic acid signaling of the nuclear mRNA cap-binding protein, ABH1. *Plant Physiology*, 130: 1276-1287.

Janda T. (2000): Thermoluminescence investigation of low temperature stress in maize. *Photosynthetica*, 38 (4): 635-639.

Jones-Rhoades M., Bartel D. (2004): Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14: 787-799.

Kaiser W. M. (1987): Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 71 (1): 142-149.

Kátia H., Joao L., Brown T. A. (1993): Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1RIF^r:pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Reports*, 12: 422-425.

Kautsky H., Appel W., Amann H. (1960): Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation, The fluorescence and the photochemistry of plants. *Biochemische Zeitschrift*, 332: 277-292.

Kertész Á. (2008): Tájdegradáció és elsivatagosodás. *Magyar tudomány*, 2008 (6): 715-723.

Király L. (2002): (Transz)gének csendesítése – a vírusrezisztencia egyik formája növényekben: I.- Két biológiai jelenség – egy mechanizmus. *Növénytermelés*, 51 (2): 223-231.

Koorneef M., Loeo-Kloosterziel K. M., Swartz S. H., Zeevaart J. A. D. (1998): The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36: 83-89.

Lafolie F. , Bruckler L. , Ozier-Lafontaine H. , Tournebize R., Mollier A. (1999): Modeling soil–root water transport and competition for single and mixed crops. *Plant and Soil*, 210: 127-143.

Lafontaine H. O., Lafolie F., Bruckler L., Tournebize R., Hollier A. (1998): Modelling competition for water in intercrops: theory and comparison with field experiments. *Plant and Soil*, 204: 183-201.

Laubinger S., Sachsenberg T., Zeller G., Busch W., Lohmann J.U., Rascht G., Weigel D. (2008): Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105 (25): 8795-8800.

Lawlor D. W. (2001): Photosynthesis. 3rd edition. Bios Scientific Publishers, Oxford.

Lawlor D. W., Cornic G. (2002): Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 275-294.

Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., Pauwels J., Anklam E., Borchers T., Braunschweiger G., Busch U., Eklund E., Eriksen F.D., Fagan J., Feller A., Gaugitsch H., Hayes D., Hertel C., Hörtnner H., Joudrier P., Kruse L., Meyer R., Miraglia M., Müller W., Philipp P., Pöpping B., Rentsch R., Wurtz A. (1999): IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82 (4): 923-8.

Marcotte, W.R. Jr.; Guiltinan, M.J.; Quatrano, R.S. (1992): ABA-regulated gene expression: cis-acting sequences and trans-acting factors. *Biochemical Society Transactions*, 20 (1): 93-97.

Maxwell K., Johnson G. N. (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345): 659-668.

Mazzucotelli E., Mastangelo A. M., Cosatti C., Guerra D., Stanca A. M., Cattivelli L. (2008): Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional regulations control transcription. *Plant Science*, 174: 420-431.

Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ. (2004): Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta*, 15; 1677 (1-3): 129-41. Review.

Miranda A., Janssen G., Hodges L., Peralta E. G., Ream W. (1992): *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. *Journal of Bacteriology*, 174: 2288-2297.

Monsanto (2009) In: <http://www.monsanto.hu/?Tartalom=hirek>

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279-289.

Ner-Gaon H., Levitan N., Rubin E., Fluhr R. (2007): Comparative cross-species alternative splicing in plants. *Plant Physiology*, 144: 1632-1641.

Nyíri I. (szerk.)(1997): Az aszálykáró mérséklése – szántóföldi növénytermesztés. Mezőgazda kiadó, Budapest. P.156.

Ozier-Lafontaine H., Lafolie F., Bruckler L., Tournebise R., Mollier A. (1998): Modelling competition for water in intercrops: theory and comparison with field experiments. *Plant and Soil*, 204: 183-201.

Oukuma K., Addicott F. T., Smith O. E., Thiessen W. E. (1965): The structure of abscisin II. *Tetrahedron Lett.* P. 2529.

Palauqui J. C., Vaucheret H. (1998): Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 9675-9680.

Papp I., Mur L. A., Dalmadi Á., Dulai S., Koncz Cs. (2004): A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 55 (5): 679-686.

Park S. H., Morris J. L., Park J. E., Hirschi K. D., Smith R. H. (2003): Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1253-1257.

- Pethő (1993): *Mezőgazdasági növények élettana*. Akadémiai Kiadó, Budapest. p. 451.
- Pfützner A. J. P. (1998): Transformation of tomato. *Methods in Molecular Biology*, 81: 359-363.
- Phillips K., Krane B., Hirschi K., Gaxiola R. (2005): Anyway you slice it, tomatoes cut through drought with new gene. *AgNews, News and Public Affairs, Texas A&M University System Agriculture Program*, <http://agnews.tamu.edu/dailynews/stories/HORT/Dec1305a.htm>
- Plant Á. L., Cohen A., Moses M. S., Bray E. A. (1991): Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced gene of tomato. *Plant Physiology*, 97: 900-906.
- Privé J.-P., Janes D. (2003): Evaluation of plant and soil moisture sensors for the detection of drought stress in raspberry. *Acta Horticulturae*, 618: 123-128.
- Rathman S. M., Mackay W. A., Nawata E., Sakuratani T., Mesbah A. S. M., Quebedeaux B. (2005): Superoxide dismutase, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco) and photosynthetic rates of drought-tolerant and drought-sensitive tomato cultivars. *XXVI International Horticultural Congress (nov. 23, Toronto, Canada) Environmental Stress and Horticulture Crops, Book of Abstracts* p.618.
- Sane P.V.; Rutherford A.W. (1986): Thermoluminescence from photosynthetic membranes. Academic Press, Orlando, Fla. (USA).
- Saqrane S., El Ghazali I., Oudra B., Bouarab L., Dekayir S., Mandi L., Ouazzani N., Vasconcelos V. M. (2009): Detection of microcystin contamination by the measurement of the variability of the in vivo chlorophyll fluorescence in aquatic plant *Lemna gibba*. *Toxicon*, 53 (1): 9-14.
- Sharp R. E., Poroyko V., Hejlek L. G., Spollen W. G., Springer G. K., Bohnert H. J., Nguyen H. T. (2004): Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55 (407): 2343-2351.
- Stam M., Mol J. N. M., Kooter J. M. (1997): Review Article: The Silence of Genes in Transgenic Plants. *Annals of Botany*, 79: 3-12.

Szabó Z., Bánfalvy Z. (2000): An *Agrobacterium*-mediated transformation system for the tomato cultivar Kecskeméti 262. *Acta Agronomica Hungarica*, 48 (3): 221-226.

Szalai J (2004): A növényi élet feltételei a kertekben. Szaktudás Kiadóház, Budapest, pp. 78-87.

Széll E., Dévényi K. (2008): Termésátlag, 2007- okok és tanulságok a kukorica-termesztésben. *Agronapló*, XII.(1).

Szilágyi J., Józsa J. (2008): Klímaváltozás és a víz körforgása. *Magyar tudomány*, 2008 (6): 698-702.

Tardieu F., Davies W.J. (1991): Integration of hídraulic and chemical signaling into the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant Cell and Environment*, 16 (4): 341-349.

Tardieu, F., Reymond, M., Hamard, P., Granier, C., Muller, B. (2000): Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 51 (350): 1505-1514.

Then Ch., Herbinger K., Luis V.C., Heerdt C., Matyssek R., Wieser G. (2009): Photosynthesis, chloroplast pigments, and antioxidants in *Pinus canariensis* under free-air ozone fumigation. *Environmental Pollution*, 157 (2): 392-395.

Tietema A., Warmerdam B., Lenting E., Riemer L. (1992): Abiotic factors regulating nitrogen transformations in the organic layer of acid forest soils – moisture and pH. *Plant and Soil*, 147 (1): 69-78.

Tinland B., Schoumacher F., Gloeckler V., Bravo-Angel A. M., Hohn B. (1995): The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO Journal*, 14: 3585-3595.

Turcsányi G. (szerk.) (1998): Mezőgazdasági növénytan. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest, p. 75-115.

van Blokland R., Van der Geest N., Mol J.N.M., Kooter J.M. (1994): Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal*, 6: 861-877.

Vass I., Inoue Y. (1992): Thermoluminescence in the study of photosystem II. *Topics in Photosynthesis*, 11: 259-294 (6 p.1/2).

Vavilin D.V., Ducruet J.M., Matorin D.N., Venediktov P.S., Rubin A.B. (1998): Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 42 (3): 233-239.

Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Lepers C., Gasciolli V., Mallory A.C., Hilbert J.L., Bartel D.P., Cr  t   P. (2004): Endogenous *trans*-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Molecular Cell*, 16 (1): 69-79.

Wang I., Holroyd G., Hetherington A.M. (2004): Seeing ‘cool’ and ‘hot’- infrared thermography as a tool for non-invasive, high-throughput screening of *Arabidopsis* guard cell signalling mutants. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1187–1193.

Wang M.B., Waterhouse P.M. (2000): High-efficiency of silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology*, 43: 67-82.

Wang Y., Ying J., Kuzma M., Chalifoux M., Sample A., McArthur C., Uchacz T., Sarvas C., Wan J., Dennis D. T., McCourt P., Huang Y. (2005): Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant Journal*, 43: 413–424.

Waterhouse P. M., Graham M. W., Wang M. (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 13959-13964.

Wei C, Tyree MT, Bennink JP. (2000): The transmission of gas pressure to xylem fluid pressure when plants are inside a pressure bomb. *Journal of Experimental Botany*, 51 (343): 309-16.

Weigelt A., Steinlein T., Beyschlag W. (2005): Competition among three dune species: the impact of water availability on below-ground processes. *Plant Ecology*, 176: 57-68.

Weighardt F., Barbati C., Paoletti C., Querci M., Kay S., De Beuckeleer M., Van den Eede G. (2004): Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea mays event. *Journal of AOAC International*, 87 (6): 1342-55.

Weising K., Scell J., Kahl G. (1988): Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and application. *Annual Review of Genetics*, 22: 291-296.

Wesley S. V. (2001): Construct design for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*, 27 (6): 581-590.

Wilson S. D. (1993): Competition and resource availability in heath and grassland in the Snowy Mountains of Australia. *Journal of Ecology*, 81: 445-451.

Wright H., DeLong J., Lada R., Prange R. (2009): The relationship between water status and chlorophyll a fluorescence in grapes (*Vitis* spp.). *Postharvest Biology and Technology*, 51 (2): 193-199.

Yang F., Xino X., Zhang S., Korpelainen H., Li C. (2009): Salt stress in *Populus cathayana* Rehder. *Plant Science*, in press.

Yoder J. I., Palys J., Alpert K., Lassner M. (1988): Ac transposition in transgenic tomato plants. *Molecular and General Genetics*, 213: 291-296.

Zaenen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. (1974): Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology*, 86: 109-127.

Zegada-Lizarazu W., Niitembu S., Iijima M. (2005): Mixed planting with legumes modified the water source and water use of pearl millet. *Plant Production Science*, 8 (4): 433-440.

Zegada-Lizarazu W., Izumi Y., Iijima M. (2006): Water competition of intercropped pearl millet and cowpea under drought and soil compaction stresses. *Plant Production Science*, 9 (2): 123-132.

Zhou Y., Zhou C., Ye L., Dong J., Xu H., Cai L., Zhang L., Wei L. (2003): Database and analyses of known alternatively spliced genes in plants. *Genomics*, 82: 584-595.

M/2 Kísérleteink során használt indítószekvenciák

CR1 CCAGAATTCCCTCTTCAAGGTACGGATTCCC
CR2 AATGTCGACCAGTATGAAGCAGAAGCCGCAGG
CR5 TAAGAATTCCAGGACCCGACCAAGCTGTCCGC
CR6 GAAGGATCCCAGTATGAAGCAGAAGCCGCAGG

leCBP1 ACCTGCAGTCGCCCTATTCGTGTTGATTT
leCBP2 AGAGGATCCGATGGTGGTCATCTTCCCTGT
leCBP3 AGTCTGCAGTGACTATGATCCAGGTCGAGG
leCBP4 TGAGTCGACGATGGTGGTCATCTTCCCTGT

FCAa CCCGTTAGGTGGTTATGGTGT
FCAb TTGGGTCTGGGACTGCTGTAT

PCR programja:

2'30"	95 °C	} 30 X
30"	95 °C	
30"	55 °C	
1'	72 °C	
7'	72 °C	

M/3. Kísérleteink során használt táptalajok

MS (Murashige Scoog táptalaj)

4,6 g/l MS salt mix, Duchefa
8 g/l Plant agar, Duchefa pH 5,7

MS 1%

4,6 g/l MS salt mix, Duchefa
8 g/l Plant agar, Duchefa
10 g/l sucrose, Duchefa pH 5,7

MS 3%

4,6 g/l MS salt mix, Duchefa
8 g/l Plant agar, Duchefa
30 g/l sucrose, Duchefa pH 5,7

Hajtásindukáló táptalaj:

4,6 g/l MS salt mix, Duchefa
8 g/l Plant agar, Duchefa

10 ml 100x B5 vitamin
30 g/l sucrose, Duchefa pH 5,7
2 mg/l Benzil amino purin (BAP)
0,1 mg/l Indol ecetsav (IAA)
500 mg/l Claforan
150 mg/l augmentin
0,5 ml acetosyringone

Szelektív gyökereztető táptalaj:

4,6 g Ms salt mix, Duchefa
10 ml 100x B5 vitamin
10 g sucrose, Duchefa
4 g agar, Duchefa
1 ml kanamycin (50 mg/ml törzsoldatból)
1 liter táptalajban.

Agrobacterium inkubációs médium:

0,0882 g MS salt mix
2,5 ml nátrium-foszfát puffer, pH 5,4
10 µl Rifampicin (50 mg/ml törzsoldatból)
8 µl Kanamycin (50 mg/ml törzsoldatból)
10 µl acetosyringone (50 mg/ml törzsoldatból)
20 ml össztérfogatban

LB

10 g/l Tryptone
5 g/l Yeast
10 g/l NaCl
15 g/l agar pH 7

2TY

16 g/l Tryptone
10 g/l Yeast
5 g/l NaCl pH 7

M/4 *Agrobacterium tumefaciens* és *Escherichia coli* kompetens sejt készítése

200 ml OD 0,3 koncentrációjú baktérium oldatot 10 percig jégen tartottuk, majd 5000 rpm-el centrifugáltuk 5 percig, 4 fokon. A leülepedett baktérium fölül leöntöttük a táptalajt, és feloldottuk 100 ml oldatban, mely 10 mM Tris-t (pH 5,4) és 50 mM CaCl₂-t tartalmazott. Az oldatot 30 percig jégen tartottuk, majd 5000 rpm-el centrifugáltuk le 4 fokos hőmérsékleten. Az

üledéket az előbb leírt oldatból 2 ml-ben oldottuk fel ismét, és 15% glicerint adagoltunk hozzá. Az így kapott kompetens sejteket -70°C-on tároltuk.

M/5 *Escherichia coli* transzformáció

Az *Escherichia coli* kompetens baktérium sejteket jégen olvasztottuk fel, majd 2 µl DNS-t tettünk 50 µl kompetens sejthez. 30 percig jégen tartottuk a mintát, majd 2 percre 42 °C-os hőszekvenciára tettük ki. Ezután 5 percig jégen tartottuk, majd 37 °C-on rázattuk 120 RPM-en 60 percen át 1 ml 2TY táptalajban. A felszaporodó baktériumot szilárd, antibiotikum tartalmú (50 mg/l Kanamycin) táptalajra szélesztettük, és egy éjszakán át neveltük 37 °C-on.

***Agrobacterium* transzformáció**

A *Agrobacterium tumefaciens* kompetens baktérium sejteket jégen olvasztottuk fel, majd 2 µl DNS-t tettünk a 50 µl kompetens sejthez. 30 percig jégen tartottuk a mintát, majd 2 percre 42 °C-os hőszekvenciára tettük ki. Ezután 5 percig jégen tartottuk, majd 30 °C-on rázattuk 120 RPM-en 60 percen át 1 ml 2TY táptalajban. A felszaporodó baktériumot szilárd, antibiotikum tartalmú (50 mg/l Kanamycin, 25 mg/l rifampicin) táptalajra szélesztettük, és egy éjszakán át neveltük 30 °C-on.

M/6 Plazmidok emésztése

5 µl DNS

1 µl BSA

2 µl enzim

2 µl puffer (az enzimtől függően)

10 µl Desztillált víz

1 órán át 37 °C-on

M/7 vektorba ligálás

2 µl vektor

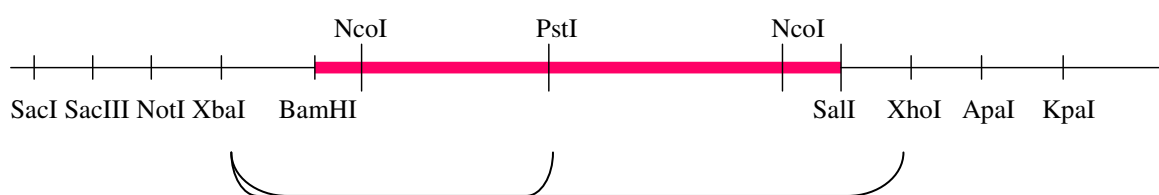
10 µl tisztított fragmens

2 µl 10x ligáz puffer (Fermentas)

5 µl desztillált víz

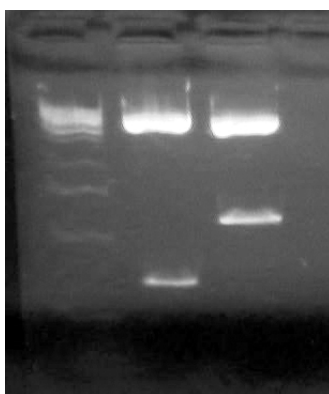
1 µl ligáz enzim (T4 DNS ligase – Fermentas) 1,5 órán át 12 °C-on

M/8 Az elkészült plazmid restrikciós térképe a fordított tükörképi szekvencia összeállítás után



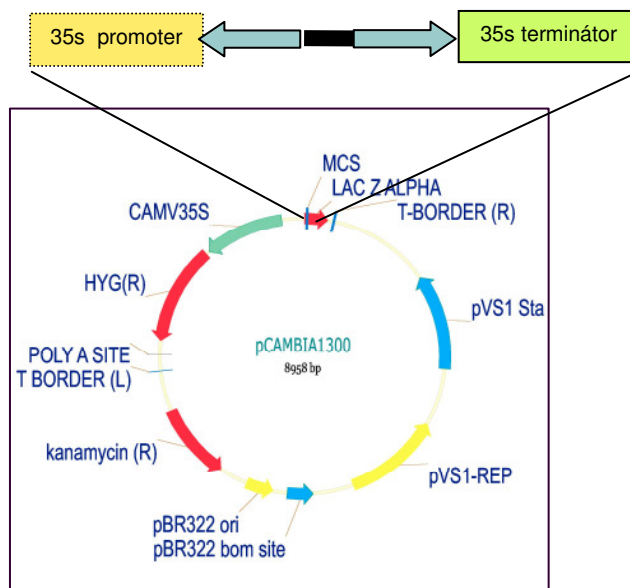
500 bp. —

300 bp. —

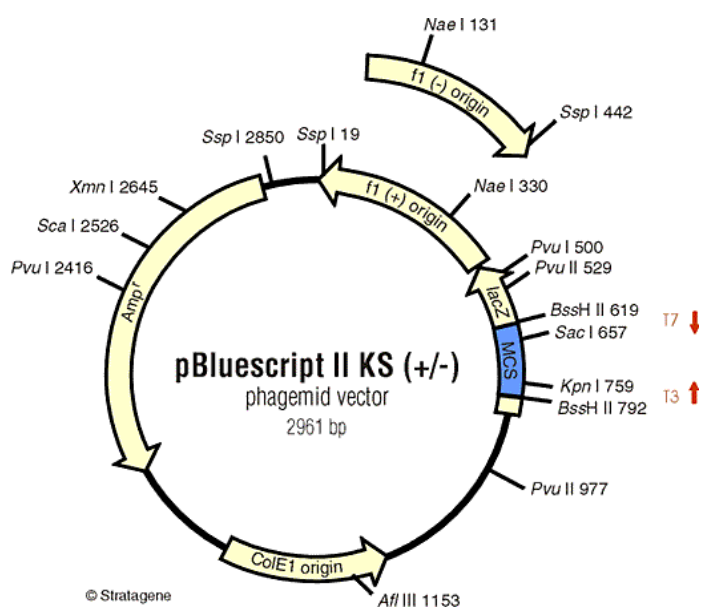


Molekulasúly marker, plazmid Xba I, Pst I emésztéssel, plazmid Xba I, Xho I enzimes emésztéssel (balról jobbra)

M/9 A felhasznált plazmidok térképei

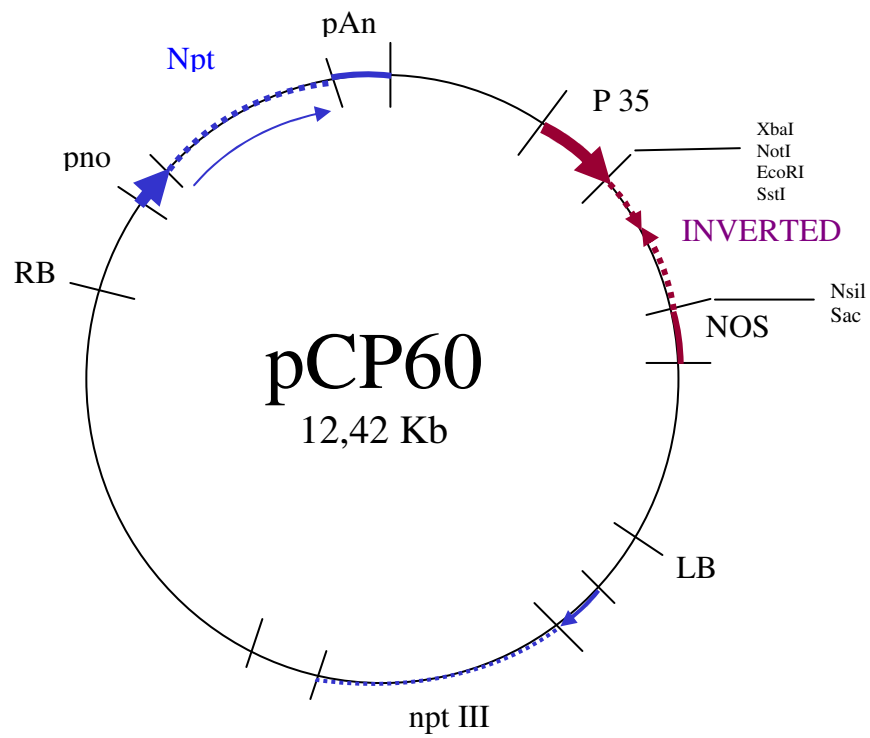


A paradicsom transzformáláshoz
használt plazmid-konstrukció és a beillesztett inzert



A pKS II. plazmid térképe a klónozóhelyekre beépített inzert nélkül (forrás:

<http://bio.classes.ucsc.edu/bio20L/info/content/molbio2/pks.gif>)



A paradicsom transzformálására alkalmas kész plazmid